

## PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION  
(PCT Rule 61.2)

|   |   |
|---|---|
| Date of mailing (day/month/year)<br>02 May 2001 (02.05.01)              | To:<br><br>Commissioner<br>US Department of Commerce<br>United States Patent and Trademark<br>Office, PCT<br>2011 South Clark Place Room<br>CP2/5C24<br>Arlington, VA 22202<br>ETATS-UNIS D'AMERIQUE<br><br>in its capacity as elected Office |
| International application No.<br>PCT/JP00/05219                         | Applicant's or agent's file reference<br>M3-104PCT  |
| International filing date (day/month/year)<br>03 August 2000 (03.08.00) | Priority date (day/month/year)<br>04 August 1999 (04.08.99)   |
| Applicant<br>SUZUKI, Susumu et al                                       |   |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

22 February 2001 (22.02.01)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

\_\_\_\_\_

2. The election  was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

|   |  |
|---|--|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland<br><br>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Authorized officer<br><br>R. Forax<br><br>Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |
|---|--|

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 特許協力条約

PCT

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕

RECD 23 NOV 2001

WIPO

PCT

|  |   |                         |
|--|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人<br>の書類記号 M3-104PCT  | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。 |                         |
| 国際出願番号<br>PCT/JPOO/05219   | 国際出願日<br>(日.月.年) 03.08.00                         | 優先日<br>(日.月.年) 04.08.99 |
| 国際特許分類 (IPC)<br>Int. Cl' G01N33/573, G01N33/50, G01N33/15, C12Q1/48, C07K7/08, C07K16/18 |   |                         |
| 出願人（氏名又は名称）<br>株式会社医学生物学研究所  |   |                         |

|   |
|---|
| 1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。   |
| 2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>3</u> ページからなる。  |
| <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。<br>(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)<br>この附属書類は、全部で <u>                  </u> ページである。   |
| 3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。   |
| I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎<br>II <input type="checkbox"/> 優先権<br>III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成<br>IV <input type="checkbox"/> 発明の單一性の欠如<br>V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明<br>VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献<br>VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備<br>VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見 |

|   |   |
|---|---|
| 国際予備審査の請求書を受理した日<br>22.02.01                                      | 国際予備審査報告を作成した日<br>02.11.01  |
| 名称及びあて先<br>日本国特許庁 (IPEA/JP)<br>郵便番号 100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官（権限のある職員）<br>竹中靖典<br>電話番号 03-3581-1101 内線 3252  |
|   | 2-J 9507<br> |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

 出願時の国際出願書類

|                                     |         |        |                      |
|-------------------------------------|---------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| 明細書                                 | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| 明細書                                 | 第 _____ | ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの          |
| 請求の範囲                               | 第 _____ | 項、     | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| 請求の範囲                               | 第 _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| 請求の範囲                               | 第 _____ | 項、     | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
| 図面                                  | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| 図面                                  | 第 _____ | ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| 明細書の配列表の部分                          | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| 明細書の配列表の部分                          | 第 _____ | ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- この国際出願に含まれる書面による配列表
- この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
- 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ
- 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項
- 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5.  この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかつたものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1-23 有  
請求の範囲 \_\_\_\_\_ 無

進歩性 (I S)

請求の範囲 1-23 有  
請求の範囲 \_\_\_\_\_ 無

産業上の利用可能性 (I A)

請求の範囲 1-23 有  
請求の範囲 \_\_\_\_\_ 無

## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1：猪俣慎一ほか「ケラチノサイトの増殖、癌化のターゲット—サイクリン・cdk複合体—」，西日本皮膚科，第57巻，第4号，1995年，pp687-695

文献2：小川誠司「細胞周期抑制因子」，血液・腫瘍科，第32巻，第2号，1996年，pp123-128

請求の範囲1-23について

上記文献1、2には、サイクリン/CDK複合体によって、Rb蛋白がリン酸化され各種生理現象のトリガーになっていることが記載されているが、それを抗体を用いて測定することについては何ら記載されていない。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
 [P C T 18条、P C T規則43、44]

|                                       |   |                         |
|---------------------------------------|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人<br>の書類記号 M3-104 P C T        | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0)<br>及び下記5を参照すること。 |                         |
| 国際出願番号<br>P C T / J P 0 0 / 0 5 2 1 9 | 国際出願日<br>(日.月.年) 03.08.00   | 優先日<br>(日.月.年) 04.08.99 |
| 出願人(氏名又は名称)<br>株式会社医学生物学研究所           |   |                         |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(P C T 18条)の規定に従い出願人に送付する。  
 この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。  
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。  
 この国際出願に含まれる書面による配列表  
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表  
 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。  
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2.  請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3.  発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は  出願人が提出したものを承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は  出願人が提出したものを承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条(P C T 規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、  
 第 \_\_\_\_\_ 図とする。  出願人が示したとおりである。

なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' G01N33/573, G01N33/50, G01N33/15, C12Q1/48, C07K7/08, C07K16/18

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' G01N33/573, G01N33/50, G01N33/15, C12Q1/48, C07K7/08, C07K16/18

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |            |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報   | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2000年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2000年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2000年 |

## 国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST, BIOSIS, WPIL

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A               | 猪俣慎一ほか「ケラチノサイトの増殖、癌化のターゲットーサイクリン・cdk複合体ー」, 西日本皮膚科, 第57巻, 第4号, 1995年, pp687-695 | 1-23             |
| A               | 小川誠司「細胞周期抑制因子」, 血液・腫瘍科, 第32巻, 第2号, 1996年, pp123-128                            | 1-23             |

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

|   |  |
|---|--|
| 国際調査を完了した日<br>31.10.00  | 国際調査報告の発送日<br>21.11.00                               |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁 (ISA/JP)<br>郵便番号 100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官(権限のある職員)<br>竹中靖典<br>電話番号 03-3581-1101 内線 3252 |

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年2月15日 (15.02.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/11367 A1

(51) 国際特許分類: G01N 33/573, 33/50,  
33/15, C12Q 1/48, C07K 7/08, 16/18

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05219

(22) 国際出願日: 2000年8月3日 (03.08.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/221612 1999年8月4日 (04.08.1999) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社 医学生物学研究所 (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.) [JP/JP]; 〒460-0002 愛知県名古屋市中区丸の内3丁目5番10号 住友商事丸の内ビル5階 Aichi (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 鈴木 進

(SUZUKI, Susumu) [JP/JP]. 玉井克之 (TAMAI, Katsuyuki) [JP/JP]. 田路真悟 (TOJI, Shingo) [JP/JP]. 小川晃 (OGAWA, Akira) [JP/JP]; 〒396-0002 長野県伊那市大字手良沢岡字大原1063-103 株式会社 医学生物学研究所内 Nagano (JP).

(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsuhi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国(国内): JP, US.

(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF ASSAYING PHOSPHORYLATION ENZYME ACTIVITY OF CYCLIN/CDK COMPLEX

(54) 発明の名称: サイクリン/CDK複合体のリン酸化酵素活性測定方法

(57) Abstract: A method of assaying the phosphorylation activity of a cyclin/CDK complex on RB protein which comprises evaluating the phosphorylation of RB protein phosphorylated by the cyclin/CDK complex by an immunological method with the use of an antibody capable of distinguishing the phosphorylated state; and a method of assaying dephosphorylation enzyme activity on RB protein which has been phosphorylated by the cyclin/CDK complex. Application of these assay methods makes it possible to screen compounds regulating these enzymatic activities.

(57) 要約:

本発明は、サイクリン/CDK複合体によってリン酸化されるRBタンパク質のリン酸化を、リン酸化状態を識別しうる抗体によって免疫学的な手法により評価し、RBタンパク質に対するサイクリン/CDK複合体のリン酸化活性を測定する方法、およびサイクリン/CDK複合体によってリン酸化されたRBタンパク質に対する脱リン酸化酵素活性を測定する方法を提供する。この測定方法を応用し、これらの酵素活性を調整する化合物のスクリーニングが可能。

WO 01/11367 A1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 明細書

## サイクリン／CDK複合体のリン酸化酵素活性測定方法

技術分野

本発明は、サイクリン／CDK複合体のリン酸化酵素活性、あるいは脱リン酸化酵素活性の測定方法、サイクリン／CDK複合体の阻害剤もしくは促進剤のスクリーニング方法、並びにそのためのキットに関する。

背景技術

細胞は増殖する際に、そのゲノムDNAを複製し、娘細胞へ均等に分配した後分裂するという過程を周期的に繰り返す。このような周期は細胞周期と呼ばれている。細胞周期はG1期(DNA合成準備期)、S期(DNA合成期)、G2期(分裂準備期)、M期(分裂期)に分けることができ、各段階を順番に経て細胞は分裂する。細胞周期の進行は数多くの分子により精緻な調節を受け、不必要的細胞の増殖を制御している。これまでに細胞周期の進行に関与する分子のクローニングや機能解析が数多く行われ、多くの癌においてこれらの細胞周期の進行に関する分子の異常が報告され、それが発癌の原因となっていると考えられている。

たとえば、G1期からS期への進行に際しては、RBタンパク質(retinoblastoma protein)のリン酸化が重要であることが明らかにされている。RBタンパク質は非リン酸化型において、E2F/DPと結合し、不活性状態におくことでS期への進行を抑制している。E2F/DPは、S期の進行に必要なジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)やDNAポリメラーゼなどの遺伝子の発現を誘導する転写因子である。サイクリンD/CDK4、サイクリンD/CDK6、あるいはサイクリンE/CDK2の作用によってリン酸化されたRBタンパク質は、E2F/DPを遊離する。ここでCDK(サイクリン依存性キナーゼ;Cyclin-

dependent kinase) は、サイクリンと複合体を形成することによってリン酸化活性を発現する酵素タンパク質である。すなわち、G1期からS期への進行はRBのリン酸化によって調節されている（実験医学別冊・BioScience用語ライブラリー「細胞周期」, p62-93, 1995, 羊土社発行）。

多くの癌症例において、RBタンパク質リン酸化の調節がうまく機能していないことが示され、このことが、不必要的S期への進行、すなわち細胞増殖を促進し、結果的に発癌に関与するものと考えられている。たとえば、サイクリン/CDK複合体の阻害因子であるp21の転写誘導に働くp53機能異常（欠失、点突然変異）は様々な腫瘍において高頻度に認められる。このような症例においてはp21が正常に産生されないために、サイクリン/CDK複合体によるRBタンパク質のリン酸化が異常に亢進され、結果的に発癌につながるのではないかと考えられる。また、p15、p16といったサイクリン/CDK複合体の阻害因子の欠損が、多くの腫瘍で報告されている。この場合も、RBタンパク質のサイクリン/CDK複合体による異常なリン酸化が癌化の要因となっているものと考えられる。さらに、サイクリンD1の発現亢進も、同様な理由で、発癌に関わっているものと考えられている。

このような背景からサイクリン/CDK複合体は抗癌剤開発の標的分子となつており、サイクリン/CDK複合体活性を調整する化合物のスクリーニングシステムを開発することは有用である。このようなスクリーニングには現状ではラジオアイソトープ（以下RIと省略する）標識化合物を用いた方法が一般的である。しかしRIの使用には、常に危険性や廃棄の問題が伴うことから、非RI標識によって実施することができるシステムが望まれていた。

他方、リン酸化酵素活性の簡便な測定方法として、PKAやPKCの活性測定方法が実用化されている。この方法は、PSペプチドと呼ばれる合成ペプチドを基質として用い、その酵素的なリン酸化を、リン酸化されたPSペプチドを認識する抗体によって検出することによって、リン酸化酵素活性を測定している（T. Yano

et al. Peptide Chemistry A. Suzuki (Ed): 293-298, 1991)。しかしこの方法において基質ペプチドとなる PS ペプチドは、RB タンパク質のリン酸化酵素であるサイクリン/CDK 複合体の基質とならない。更に、この方法で用いられているリン酸化の程度を検出するための抗体は、リン酸化された RB タンパク質を認識するものではないため RB タンパク質のリン酸化酵素活性の測定には利用することができない。リン酸化 RB タンパク質を認識する抗体は公知であるが、これらの抗体を用いて RB タンパク質のリン酸化酵素活性が測定可能なことは知られていない。

### 発明の開示

本発明は、RB タンパク質をリン酸化する酵素であるサイクリン/CDK 複合体の活性測定方法、あるいはこれらのリン酸化酵素の作用によってリン酸化された RB タンパク質に対する脱リン酸化活性の測定方法の提供を課題とする。また、本発明は、サイクリン/CDK のリン酸化活性を制御することができる化合物のスクリーニング方法の提供を課題とする。また本発明は、RB タンパク質を基質としたサイクリン/CDK 複合体のリン酸化酵素活性を制御することができる化合物のスクリーニング方法の提供を課題とする。更に本発明は、単にこれらのリン酸化酵素活性を測定することのみならず、複数のサイクリン/CDK 複合体が共存する試料におけるサイクリン/CDK 複合体のリン酸化活性を個別に把握することができる測定方法の提供を課題とする。本発明は、これらの活性測定方法、あるいはスクリーニング方法として、RI 標識化合物の使用を避けることができる新たなシステムの提供を課題とする。加えて本発明は、これら測定方法やスクリーニング方法のためのキットの提供を課題とする。

本発明は、上記課題を解決するために、サイクリン/CDK 複合体によってリン酸化される基質として RB タンパク質を用い、RB タンパク質のリン酸化のレベルの変化を、免疫学的に測定することによって、サイクリン/CDK 複合体の

リン酸化活性の把握が可能なのではないかと考えた。RBタンパク質は先に述べたとおり発癌との関連性が多く報告されていることから、基質タンパク質として好適である。本発明者らは、RBタンパク質の被リン酸化部位の中でも、特に356位のスレオニン残基、612位のセリン残基、780位のセリン残基、あるいは807位のスレオニン残基等におけるリン酸化状態が、サイクリン/CDK複合体のリン酸化活性の評価に特に有用であると考えた。そして、これらの被リン酸化部位のリン酸化状態を識別しうる抗体を利用することにより、簡便に基質のリン酸化レベルの評価が可能であることを見出した。さらに、本発明者らはこれらの抗体を利用することにより、酵素活性によるRBタンパク質のリン酸化や脱リン酸化を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニングが可能であることを見出し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、以下のサイクリン/CDK複合体のリン酸化酵素活性測定方法、脱リン酸化酵素活性測定方法、ならびにこれらの測定方法に基づくサイクリン/CDK複合体の、リン酸化酵素や脱リン酸化酵素の活性を調整する化合物のスクリーニング方法に関する。

〔1〕次の工程を含む、試料中のサイクリン/CDK複合体の、RBタンパク質またはその部分ペプチドに対するリン酸化酵素活性の測定方法。

(a) RBタンパク質基質と試料とを、リン酸化酵素によるリン酸化反応に必要な条件下で接触させる工程

(b) RBタンパク質基質のリン酸化レベルの変化を、前記基質のリン酸化状態を識別しうる抗体との反応性の変化に基づいて検出する工程

〔2〕以下の工程を含む、サイクリン/CDK複合体の、RBタンパク質に対するリン酸化酵素活性を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニング方法。

(a) サイクリン/CDK複合体、およびRBタンパク質基質とを、被検化合物の存在下、リン酸化反応に必要な条件下で接触させインキュベートする工程

(b) RBタンパク質基質のリン酸化レベルの変化を、前記基質のリン酸化状態を識別しうる抗体との反応性の変化に基づいて検出する工程

(c) 被検化合物の非存在下における基質のリン酸化のレベルと比較して、基質のリン酸化のレベルの変化を低下もしくは上昇させる化合物を選択する工程

(3) 以下の工程を含む、試料中のリン酸化されたRBタンパク質に対する脱リン酸化酵素活性の測定方法であって、前記リン酸化されたRBタンパク質が、サイクリン/CDK複合体によってリン酸化されたものである方法。

(a) リン酸化されたRBタンパク質基質と試料とを、脱リン酸化反応に必要な条件下で接触させインキュベートする工程

(b) RBタンパク質基質のリン酸化レベルの変化を、前記基質のリン酸化状態を識別しうる抗体との反応性の変化に基づいて検出する工程

(4) 以下の工程を含む、リン酸化されたRBタンパク質に対する脱リン酸化酵素活性を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニング方法。

(a) 前記リン酸化されたRBタンパク質に対する脱リン酸化酵素、およびリン酸化されたRBタンパク質基質を、被検化合物の存在下、脱リン酸化反応に必要な条件下で接触させインキュベートする工程

(b) RBタンパク質基質の脱リン酸化レベルの変化を、前記基質のリン酸化状態を識別しうる抗体との反応性の変化に基づいて検出する工程

(c) 被検化合物の被存在下における基質の脱リン酸化のレベルと比較して、基質の脱リン酸化レベルの変化を低下もしくは増加させる化合物を選択する工程

(5) サイクリンが、サイクリンA、サイクリンB、サイクリンD1、サイクリンD2、サイクリンD3、およびサイクリンEで構成される群から選択されるいずれかのサイクリンである、〔1〕-〔4〕のいずれかに記載の測定方法。

(6) CDKが、CDK1、CDK2、CDK4、およびCDK6で構成される群から選択されるいずれかのCDKである、〔1〕-〔4〕のいずれかに記載の測定方法。

〔7〕サイクリン／CDK複合体が、以下の群から選択されるいずれかの組み合  
わせからなる〔1〕－〔4〕のいずれかに記載の測定方法。

サイクリンA／CDK1、

サイクリンA／CDK2、

サイクリンB／CDK1、

サイクリンD1／CDK4、

サイクリンD1／CDK6、

サイクリンD2／CDK4、

サイクリンD2／CDK6、

サイクリンD3／CDK4、

サイクリンD3／CDK6、および

サイクリンE／CDK2

〔8〕リン酸化酵素がサイクリンD1／CDK4であり、抗体がRBタンパク質  
の780位セリンのリン酸化状態を識別しうるものである〔7〕に記載の方法。

〔9〕リン酸化状態を識別することができる抗体が、そのリン酸化部位を識別し  
うるものであり、異なる部位をリン酸化する複数のサイクリン／CDK複合体が  
共存する試料に含まれるサイクリン／CDK複合体の活性を個別に測定する

〔1〕に記載の方法。

〔10〕抗体が、リン酸化されていないRBタンパク質基質よりも、リン酸化さ  
れたRBタンパク質基質との反応性が高いものである〔1〕－〔4〕のいずれか  
に記載の方法。

〔11〕抗体が、リン酸化されたRBタンパク質基質よりも、リン酸化されてい  
ないRBタンパク質基質との反応性が高いものである〔1〕－〔4〕のいずれか  
に記載の方法。

〔12〕RBタンパク質基質が標識されている、〔1〕－〔4〕のいずれかに記  
載の方法。

〔13〕RBタンパク質基質が固相化されている、〔1〕-〔4〕のいずれかに記載の方法。

〔14〕抗体が標識されている、〔1〕-〔4〕のいずれかに記載の方法。

〔15〕RBタンパク質基質のリン酸化レベルの評価をELISA法により行う、

〔1〕-〔4〕のいずれかに記載の方法。

〔16〕〔2〕に記載のスクリーニング方法により単離することができる化合物を主成分として含む、サイクリン/CDK複合体のタンパク質リン酸化酵素の活性調整剤。

〔17〕〔4〕に記載のスクリーニング方法により単離することができる化合物を主成分として含む、サイクリン/CDK複合体のタンパク質リン酸化酵素によってリン酸化されたタンパク質に対する脱リン酸化酵素の活性調整剤。

〔18〕天然由来である、〔16〕または〔17〕のいずれかに記載の活性調整剤。

〔19〕RBタンパク質、またはヒト以外の種におけるそのホモログの被リン酸化部位を含むアミノ酸配列からなるペプチドを含む、〔1〕-〔4〕のいずれかに記載の方法に用いるための抗体作成用免疫原。

〔20〕被リン酸化部位がリン酸化されている〔19〕に記載の免疫原。

〔21〕被リン酸化部位が、ヒトRBタンパク質における356位のスレオニン、612位のセリン、780位のセリン、および807位のスレオニンからなる群から選択される少なくとも1つである〔19〕または〔20〕のいずれかに記載の免疫原。

〔22〕被リン酸化部位が、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、および配列番号：8のいずれかからなるアミノ酸配列から選択される〔21〕に記載の免疫原。

〔23〕RBタンパク質基質のリン酸化状態を識別する抗体を含む、〔1〕-〔4〕に記載のいずれかの方法のためのキット。

なお、本発明において「ペプチド」とは、2個以上のアミノ酸がペプチド結合により結合した化合物を指し、その鎖長は問わない。従って、タンパク質もまた本発明における「ペプチド」に含まれる。

本発明で測定の対象としているサイクリン／CDK複合体を構成するサイクリンとしては、たとえばサイクリンA、サイクリンB、サイクリンD1、サイクリンD2、サイクリンD3、およびサイクリンEが知られている。一方CDKには、たとえばCDK1、CDK2、CDK4、およびCDK6が公知である。これらのタンパク質を構成するアミノ酸配列や、それをコードするDNAの塩基配列も明らかにされている。サイクリンとCDKの組み合わせとしては、たとえば次の組み合わせが報告されている。しかし、本発明のサイクリン／CDK複合体は、これらの公知の組み合わせに限定されない。

サイクリンA／CDK1、

サイクリンA／CDK2、

サイクリンB／CDK1、

サイクリンD1／CDK4、

サイクリンD1／CDK6、

サイクリンD2／CDK4、

サイクリンD2／CDK6、

サイクリンD3／CDK4、

サイクリンD3／CDK6、および

サイクリンE／CDK2

複合体を構成するサイクリンとCDKは、ヒト組織に由来する天然の酵素の他、それをコードする遺伝子を適当な発現系で発現させることによって得ることができる組み換え体であっても良い。また、酵素の由来は、ヒトに限定されずに、他の脊椎動物や、微生物におけるホモログであることができる。更に、天然の酵素タンパク質と同一のアミノ酸配列を持つ酵素のみならず、その酵素活性の発現を

支える領域（キナーゼ領域）のみで構成される変異体、あるいはこの領域を他のタンパク質と融合させた融合タンパク質等、本質的に同じ酵素活性を持つ酵素タンパク質は、いずれも本発明によるリン酸化酵素活性の測定方法の対象とすることができる。

本発明は、第一にサイクリン／CDK複合体によってリン酸化されるRBタンパク質基質に特異的に結合する抗体を利用した、サイクリン／CDK複合体のリン酸化活性の測定方法に関する。より具体的には、次の工程（a）および（b）を含む測定方法である。

（a）RBタンパク質基質と試料とを、リン酸化酵素によるリン酸化反応に必要な条件下で接触させる工程

（b）RBタンパク質基質のリン酸化レベルの変化を、前記基質のリン酸化状態を識別しうる抗体との反応性の変化に基づいて検出する工程

本発明において、RBタンパク質基質とは、ヒトRBタンパク質、他の種におけるRBタンパク質のホモログ、並びにこれらのタンパク質の少なくとも被リン酸化部位を含む部分ペプチドを意味する。更に被リン酸化部位とは、少なくともリン酸化されるアミノ酸の前後1アミノ酸を含む3アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を言う。基質となるRBタンパク質やそのホモログは、天然のもの、遺伝子組換え技術を利用して調製されたもの、合成ペプチドのいずれであることもできる。RBタンパク質(Nature 329, 6140, 642-645, 1987; GenBank Acc. No. M28419)やそのホモログであるp107(Cell 66, 1155-1164, 1991; Genes Dev. 7/7A, 1111-1125, 1993; GenBank Acc. No. L14812)やp130(Genes Dev. 7/12A, 2366-2377, 1993; GenBank Acc. No. X76061)の構造は公知であり、それをコードするDNAの塩基配列も明らかにされている。ペプチドの精製を容易にする目的で他のペプチド（例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）と融合されていてもよい。RBタンパク質基質は、予想される酵素活性に対して十分な量で使用する。例えばある基質濃度でリン酸化反応を行ったときに、基質の

大部分がリン酸化されるような場合は、基質が不足する心配がある。このようなケースでは、基質濃度を高める、あるいは試料の希釀等によって、基質のリン酸化酵素活性に対する相対濃度を上げることが望まれる。

RBタンパク質基質として、RBタンパク質やそのホモログの被リン酸化領域を含む部分アミノ酸配列で構成されるペプチド断片を利用することもできる。たとえばヒトRBタンパク質のアミノ酸配列から選択した、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、あるいは配列番号：8として示したアミノ酸配列のいずれかを含むペプチドは、RBタンパク質基質として利用することができる。また、これらのペプチドの被リン酸化部位がリン酸化されたペプチドは、本発明におけるリン酸化ペプチドとして利用することができる。

本発明においてRBタンパク質基質は、サイクリン/CDK複合体によるリン酸化が可能な条件下で試料と接触させられる。リン酸化が可能な条件とは、目的とするサイクリン/CDK複合体の活性の維持に必要なpHを与える反応媒体中で、RBタンパク質基質とともに反応に必要な成分の存在下、適切な反応温度でインキュベートすることを意味する。反応に必要な成分としては、リン酸化反応に必要なリン酸基を供給する基質、リン酸化反応物を保護する目的で添加するフオスファターゼ阻害剤等が挙げられる。リン酸基を供給する基質には、一般にアデノシン3'リン酸（以下ATPと省略する）等が用いられ、フオスファターゼ阻害剤としてはβ-グリセロリン酸等が用いられる。本発明において用いられるリン酸化反応のための緩衝液として、次の組成からなるサイクリン/CDK用反応バッファーを示すことができる。

サイクリン/CDK用反応バッファー：

50mM HEPES

15mM MgCl<sub>2</sub>

1mM DTT

0.02% Triton X

1mM EGTA

5mM ATP

本発明では、リン酸化されたRBタンパク質基質は、そのリン酸化状態を識別することができる抗体との免疫学的な反応によって、リン酸化のレベルが評価される。本発明において、リン酸化のレベルとは、RBタンパク質基質に占めるリン酸化RBタンパク質基質の割合のみならず、RBタンパク質基質上のリン酸化の程度を意味する用語として用いる。したがって、たとえばRBタンパク質基質のリン酸化レベルの上昇とは、リン酸化された基質の割合が増大する状態、あるいは基質上のリン酸化部位が増大する状態のいずれをも意味する。

本発明に用いるリン酸化状態を識別しうる抗体とは、リン酸化の有無によりRBタンパク質基質との反応性が変化する抗体を意味する。具体的には、リン酸化されたRBタンパク質基質に対する反応性が、リン酸化されていない状態に対する反応性よりも大きい（または小さい）抗体を示すことができる。RBタンパク質基質のリン酸化状態を識別しうる抗体は公知である。同様の抗体は、当業者に公知の方法（例えば、細胞工学 別冊 抗ペプチド抗体実験プロトコール 1994年 秀潤社、B.M.Turner and G.Fellows, Eur. J. Biochem. 179, 131-139, 1989, S.Muller et al. Molecular Immunology Vol 24, 779-789, 1987, Pfeffer, U., Ferrari, N. and Vidali, G. J. Bio. Chem. 261, 2496-2498, 1986）により調製することができる。抗体としては、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよい。

たとえばリン酸化RBタンパク質基質特異的なポリクローナル抗体は、リン酸化ペプチドで免疫することによって得た抗血清から、非リン酸化ペプチドカラム（非特異反応抗体吸収用カラム）やリン酸化ペプチドカラム（特異抗体精製用カラム）を用いて精製することができる。あるいはリン酸化ペプチドで免疫した動物の抗体産生細胞から樹立したハイブリドーマから、特異抗体を産生するものをスクリーニングすることによって、モノクローナル抗体を産生するハイブリ

ドーマをクローニングすることができる。スクリーニングは、培養上清の非リン酸化ペプチドやリン酸化ペプチドに対する反応性をELISA法により調べ、リン酸化ペプチドに対して反応性の高いクローンを選択することにより行う。クローニングされたハイブリドーマを培養すれば、必要なモノクローナル抗体を培養上清や腹水から精製することができる。

本発明で用いる抗体を作製するための免疫原は、ヒトRBタンパク質の被リン酸化部位を構成するアミノ酸配列を含むペプチドを用いて作成することができる。したがって、たとえば配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、あるいは配列番号：8として示したようなヒトRBタンパク質の被リン酸化部位を持つ部分アミノ酸配列を含む領域を選択することにより、本発明の免疫原とすることができます。被リン酸化部位とは、少なくともリン酸化されるアミノ酸の前後1アミノ酸を含む3アミノ酸残基からなる。なお本発明の免疫原を構成するペプチドのアミノ酸配列は、ヒトRBタンパク質に限定されない。すなわち、他の種におけるRBタンパク質のホモログを構成するアミノ酸配列から、前記被リン酸化部位を構成するアミノ酸配列を含む領域を選択し本発明の免疫原とすることができます。RBタンパク質のホモログとしては、p107やp130が公知である。これらのホモログのアミノ酸配列に基づいて調製された免疫原によって、ヒトのRBタンパク質のリン酸化を識別することができる抗体を得ることができる。

免疫原に用いるペプチドの被リン酸化部位におけるリン酸化の有無により、抗体の反応性が左右される。すなわち、リン酸化したペプチドを用いれば、リン酸化RBに対する反応性が高い抗体が、逆にリン酸化されていなければ非リン酸化RBタンパク質に対する反応性が高い抗体を得ることができる。免疫原を構成するペプチドは、たとえば化学的に合成されたものや、遺伝子組み換え体、あるいは天然のRBタンパク質やそのホモログ、並びにそれらの断片として得ることができる。これらのペプチドを目的とする部位において特異的にリン酸化する方法も公知である。ペプチドは、キャリアタンパク質と共有結合させることで免疫

原性を高めることができる。キャリアータンパク質には、一般にキーホール・リンペット・ヘモシアニン(keyhole limpet hemocyanin)等が利用される。キャリアータンパク質との共有結合のための架橋物質としてはm-マレイミドベンゾイール-N-ヒドロキシスクシニミドエステルが利用できる。このようにして得られた免疫原には、さらに公知のアジュバントを配合することができる。

本発明の望ましい実施態様においては、単にリン酸化状態を識別しうるのみならず、RBタンパク質基質の被リン酸化部位の周囲を含めた構造の相違を認識することができる抗体に基づいた測定方法が提供される。サイクリン/CDK複合体は必ずしもRBタンパク質基質の同じ部分をリン酸化するわけではない。たとえば、サイクリンD1/CDK4は、RBタンパク質の780位のセリン残基、795位のセリン残基、811位のスレオニン残基を中心としてリン酸化が進行する。一方、サイクリンB/CDK2は、主たるリン酸化部位は356位のスレオニン残基、821位のスレオニン残基である。両者の特異性を表1にまとめた。なお本発明においては、アミノ酸を示すコード（1文字または3文字）の後に、RBタンパク質におけるN末端から数えたそのアミノ酸残基の位置を表示することによりアミノ酸を特定する。たとえば、S780は、780位のセリンを意味する。

表1

| 被リン酸化部位 | サイクリン／CDK複合体の種類 |        |        |
|---------|-----------------|--------|--------|
|         | D1/CDK4         | E/CDK2 | B/CDK2 |
| T 3 5 6 | -               | +++    | ++     |
| T 3 7 3 | +               | +      | -      |
| S 6 0 8 | ++              |        |        |
| S 6 1 2 | -               | +++    | -      |
| S 7 8 0 | +++             | -      | -      |
| S 7 9 5 | +++             | +      | -      |
| T 8 0 7 | ++              | -      | -      |
| T 8 1 1 | +++             | ++     | -      |
| T 8 2 1 | -               | +++    | ++     |
| T 8 2 6 | -               | ++     | -      |

したがって、たとえば780位セリンのリン酸化状態を識別しうる抗体を利用すれば、サイクリンD1／CDK4複合体のリン酸化酵素活性を特異的に測定することができる。このように、被リン酸化部位を特異的に認識する抗体を利用することによって、サイクリンD1／CDK4によるリン酸化と、サイクリンB／CDK2によるリン酸化とを区別して評価することができる。すなわち本発明は、複数のサイクリン／CDK複合体が共存する可能性のある試料を用い、個々のリン酸化活性を独立して把握することができる測定方法を提供する。

R B タンパク質基質と抗体との反応は、公知のイムノアッセイの原理を利用して検出することができる。一般的には、R B タンパク質基質と抗体のいずれかを固相化した状態で用いることにより、未反応成分との分離を容易に行うことができる。タンパク質やペプチド、あるいは抗体を固相化する方法は公知である。たとえばR B タンパク質基質や抗体は、化学結合や物理吸着によって固相に直接固定できる。またR B タンパク質基質をビオチン化しておけば、ストレプトアビジ

ンを感作した固相に捕捉し間接的に固相化することができる。一般的に、RBタンパク質基質を固定化する場合には、タンパク質の担体への吸着が飽和する条件で行われる。この場合、ビオチン化したRBタンパク質基質の固相化は、試料との接触前、接触後、あるいは接触と同時等、任意のタイミングで行うことができる。更に、互いに親和性を有する組み合わせであれば、アビジン-ビオチン系以外でも本発明に適用することができる。たとえば、RBタンパク質基質を適当な抗原性物質との接合体としておき、この抗原性物質に対する抗体を感作した固相を利用してRBタンパク質基質の捕捉が可能である。

本発明において、RBタンパク質基質や抗体を固定化するための固相としては、反応容器の内壁、粒子状担体、あるいはビーズ状担体など、一般的に固相として利用されているものを利用することができます。その素材についても、一般にタンパク質の物理吸着や化学結合に利用されているものを利用することができます。具体的には、ポリスチレン製のマイクロタイプレート等が利用される。

本発明において、リン酸化のレベルの変化をイムノアッセイの原理に基づいて評価するとき、RBタンパク質基質と抗体とは、そのいずれかを標識しておくことにより、簡便な操作を実現できる。標識としては、検出可能な感度を有すれば特に制限はなく、例えば、ペルオキシダーゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、アルカリフェオスマターゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、アセチルコリンエ斯特ラーゼなどの酵素標識、デルフィニウムなどの蛍光標識、放射標識などを用いることが可能である。また直接標識のみならず、該抗体と特異的に結合する物質、例えば、二次抗体、プロテインA、プロテインG、プロテインA/G（AとGの融合タンパク質）などを標識する、いわゆる間接標識系を利用することもできる。

RBタンパク質基質のリン酸化レベルの評価は、抗体の特異性と上記標識に応じて当業者に公知の方法で行うことができる（例えば、超高感度酵素免疫測定法 石川榮治著 学会出版センター（1993）参照）。すなわち、リン酸化されたRBタンパク質基質との反応性を持つ抗体を標識したRBタンパク質と組み合わせ

て利用する場合には、抗体と反応した標識RBタンパク質基質に由来するシグナルの大きさがリン酸化活性に比例する。逆に、リン酸化されないRBタンパク質との反応性を持つ抗体を用いれば、シグナルの大きさはリン酸化活性と逆比例することになる。リン酸化レベルは、リン酸化レベルが判明しているRBタンパク質基質を標準試料として予め作成した検量線に基づいて定量化することができる。あるいは、リン酸化酵素活性フリーの試料を対照として、定性的な比較を行うこともできる。

本発明によるリン酸化酵素活性の測定方法は、サイクリン/CDK複合体の存在が疑われるあらゆる試料を対象とすることができる。代表的な試料としては、ヒトや非ヒト動物に由来する組織、各種培養細胞の抽出液およびその抽出物、細胞の培養上清、血液、尿、体液、汗、唾液、母乳などの分泌物等を示すことができる。

本発明は、リン酸化酵素活性のみならず、サイクリン/CDK複合体によってリン酸化されたRBタンパク質基質に対する脱リン酸化酵素活性の測定方法をも提供する。本発明に基づく脱リン酸化酵素活性の測定方法は、以下の工程(a)および(b)を含む。

- (a) リン酸化されたRBタンパク質基質と試料とを、脱リン酸化反応に必要な条件下で接触させインキュベートする工程
- (b) 基質のリン酸化レベルの変化を、前記基質のリン酸化状態を識別しうる抗体との反応性の変化に基づいて検出する工程

RBタンパク質基質のリン酸化は、前記リン酸化が可能な条件下で、サイクリン/CDK複合体によってRBタンパク質を処理することによって得ることができる。

脱リン酸化酵素活性の測定に用いる、RBタンパク質基質のリン酸化状態を識別しうる抗体とは、先に述べたものと同じ抗体を利用することができる。また、イムノアッセイに基づくRBタンパク質基質のリン酸化レベルの評価方法も、先

に述べたのと同様の原理に基づいて実施することができる。ただし、脱リン酸化酵素活性における標識RBタンパク質基質（あるいは標識抗体）に由来するシグナルの大きさと、測定すべき酵素活性の大きさの関係が逆になる点のみが相違する。

現在のところ、ヒトの生体内でサイクリン/CDK複合体によってリン酸化されたタンパク質の脱リン酸化酵素として機能しているタンパク質は同定されていない。しかし組織抽出液、細胞抽出液中等に含まれるトータルプロテインフォスファターゼ活性を測定するという測定系となりうる。

本発明の脱リン酸化酵素活性の測定方法は、リン酸化酵素活性の測定方法と同様に、その存在が疑われるあらゆる試料を測定対象とすることができる。たとえば、抽出液中に含まれる脱リン酸化酵素の精製を試みようとする場合、各画分に見出される脱リン酸化酵素活性は、酵素の精製の指標として有用である。

本発明に基づくリン酸化酵素、あるいは脱リン酸化酵素活性の測定方法は、それぞれリン酸化酵素、あるいは脱リン酸化酵素の阻害剤もしくは促進剤のスクリーニングに利用することができる。すなわち本発明は、リン酸化酵素、あるいは脱リン酸化酵素の活性を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニング方法に関する。本発明において、これらの酵素活性を阻害、あるいは促進する化合物を総称して酵素活性を調整する化合物と呼ぶ。

本発明に基づくリン酸化酵素活性を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニング方法は、以下の工程（a）－（c）を含む。

- (a) サイクリン/CDK複合体、およびRBタンパク質基質と、被検化合物の存在下、リン酸化反応に必要な条件下で接触させインキュベートする工程
- (b) RBタンパク質基質のリン酸化レベルの変化を、前記基質のリン酸化状態を識別しうる抗体との反応性の変化に基づいて検出する工程
- (c) 被検化合物の非存在下における基質のリン酸化のレベルと比較して、基質のリン酸化のレベルの変化を低下もしくは上昇させる化合物を選択する工程

サイクリン／CDK複合体とRBタンパク質基質との接触、およびRBタンパク質基質のリン酸化レベルの評価は、上記のリン酸化酵素活性の測定方法と同様に行うことができる。その結果、被検化合物の非存在下でRBタンパク質基質のセリン残基またはスレオニン残基に結合しているリン酸基の検出量が低下すれば、スクリーニングに用いた被検化合物は、リン酸化酵素の活性を促進すると判定される。

本発明によるスクリーニングに用いるリン酸化酵素には、天然のサイクリン／CDKのみならず、組み換え体として得られる酵素タンパク質を利用することができる。また天然の酵素と同じアミノ酸配列を持つもののみならず、そのキナーゼ領域のみからなる酵素断片を用いることもできる。キナーゼ領域のみを用いることにより、発現生成物を小さくすることができ、その結果として組み換え体としてより多量の酵素タンパク質を容易に得ることができる。

一方、本発明に基づく脱リン酸化酵素活性を阻害する、もしくは促進する化合物のスクリーニング方法は、以下の工程の（a）－（c）を含む。

（a）前記リン酸化されたRBタンパク質に対する脱リン酸化酵素、およびリン酸化されたRBタンパク質基質を、被検化合物の存在下、脱リン酸化反応に必要な条件下で接触させインキュベートする工程

（b）RBタンパク質基質の脱リン酸化レベルの変化を、前記基質のリン酸化状態を識別しうる抗体との反応性の変化に基づいて検出する工程

（c）被検化合物の被存在下における基質の脱リン酸化のレベルと比較して、基質の脱リン酸化レベルの変化を低下もしくは増加させる化合物を選択する工程

これらのスクリーニング方法において用いられる被検化合物としては、例えば、ペプチド（タンパク質を含む）、合成低分子化合物、動植物や細菌の細胞抽出物、細胞培養上清などが用いられるが、これらに制限されない。また、脱リン酸化酵素としては、例えば、大腸菌アルカリフオスファターゼ、牛小腸アルカリフオス

ファターゼ、ならびにヒト Cdc25、Cdc14 等のプロテインフォスファターゼ等を用いることができる。

脱リン酸化酵素とリン酸化されたRBタンパク質基質との接触、およびRBタンパク質基質のリン酸化レベルの評価は、上記の脱リン酸化酵素活性の検出方法と同様に行うことができる。その結果、被検化合物の非存在下でRBタンパク質基質のセリン残基および／またはスレオニン残基に結合しているリン酸基を検出した場合（対照）と比較して、RBタンパク質のセリン残基および／またはスレオニン残基に結合しているリン酸基の検出量が増加していれば、スクリーニングに用いた被検化合物は、脱リン酸化酵素の活性を阻害すると判定される。逆に、RBタンパク質のセリン残基および／またはスレオニン残基に結合しているリン酸基の検出量が低下していれば、スクリーニングに用いた被検化合物は、脱リン酸化酵素の活性を促進すると判定される。

これら本発明のスクリーニング方法において、被検化合物として、動植物や細菌の細胞抽出物、細胞培養上清などを用いた場合には、当業者に公知の方法（例えば、各種クロマトグラフィー）によりこれらを分画して、それぞれ検出を行うことにより、リン酸化（または脱リン酸化）酵素の活性を阻害する単一の化合物を最終的に特定することが可能である。これらスクリーニングにより単離されたリン酸化酵素および脱リン酸化酵素の活性を阻害もしくは促進する化合物は、これらの酵素活性の活性調整剤として利用することができる。これらの化合物は、特に癌治療薬やリウマチ治療薬の候補化合物として有用である。本発明のスクリーニング法により単離される化合物を、リン酸化酵素活性、あるいは脱リン酸化酵素活性の活性調整剤として用いる場合には、公知の製剤学的製造法により製剤化して用いることも可能である。例えば、薬理学上許容される担体または媒体（生理食塩水、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤など）とともに患者に投与される。投与は、化合物の性質に応じて、経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、静脈内、または経口的に行われる。投与量は、患者の年齢、体重、症状、投

与方法などにより変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することが可能である。

加えて本発明は、上記測定方法、またはスクリーニングに用いる、RBタンパク質基質のリン酸化状態を識別することができる抗体を含むキットに関する。本発明のキットは、リン酸化酵素活性の検出に用いる場合には、前記抗体以外に、例えばRBタンパク質基質および緩衝液等で構成される。また、脱リン酸化酵素活性の検出に用いる場合には、前記抗体以外に、リン酸化されたRBタンパク質基質および緩衝液で構成される。これら酵素の活性を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニングに用いる場合には、さらにリン酸化酵素（あるいは脱リン酸化酵素）を組み合わせる。RBタンパク質基質、あるいは前記抗体のいずれかは、上記のような標識を付与することができ、他方を固相化しておくことができる。

キットには、リン酸化酵素（あるいは脱リン酸化酵素）の活性や、測定系そのものの検定のために、酵素標品やRBタンパク質基質標品を組み合わせることができる。これらの標品や、前記抗体には、安定化などのための他の成分を加えることができる。例えば、1%程度のBSA、および終濃度0.2~10%（好ましくは1%）のシーカローズ、フルクトースなどのポリオール類を、標品中に凍結乾燥後のタンパク質変性防止剤として添加することができる。以下、実施例に基づいて本発明を更に詳細に説明する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、ELISA法によるRB各部位のリン酸化反応測定結果について示した図である。各グラフには、測定に用いたモノクローナル抗体の名称とそれが認識するリン酸化部位を示した。また図中、D1/4はCyclin D1/CDK4、E/2はCyclin E/CDK2、A/2はCyclin A/CDK2、B/1はCyclin B/CDK1の組み合わせをそれぞれ示す。

図2は、Cyclin B/CDK1を用いたときの、阻害剤K252a(K)、Olomoucine(0)、Roscovitine(R)各々の阻害効果についてELISA法で検討した結果を示した図である。

図3は、Cyclin A/CDK2を用いたときの、阻害剤K252a(K)、Olomoucine(0)、Roscovitine(R)各々の阻害効果についてELISA法で検討した結果を示した図である。

図4は、Cyclin E/CDK2を用いたときの、阻害剤K252a(K)、Olomoucine(0)、Roscovitine(R)各々の阻害効果についてELISA法で検討した結果を示した図である。

図5は、Cyclin D1/CDK4を用いたときの、阻害剤K252a(K)、Olomoucine(0)、Roscovitine(0)各々の阻害効果についてELISA法で検討した結果を示した図である。

図6は、Cyclin B/CDK1を用いたときの、阻害剤Olomoucine-isomer(0i)及びU0126(U)の阻害効果についてELISA法で検討した結果を示した図である。

図7は、Cyclin A/CDK2を用いたときの、阻害剤Olomoucine-isomer(0i)及びU0126(U)の阻害効果についてELISA法で検討した結果を示した図である。

図8は、Cyclin E/CDK2を用いたときの、阻害剤Olomoucine-isomer(0i)及びU0126(U)の阻害効果についてELISA法で検討した結果を示した図である。

図9は、Cyclin D1/CDK4を用いたときの、阻害剤Olomoucine-isomer(0i)及びU0126(U)の阻害効果についてELISA法で検討した結果を示した図である。

図10は、ELISA法とRI法との感度比較の結果を示した図である。実線はELISA法、破線はRI法を示す。

図11は、Cyclin/CDK活性に対する阻害剤Olomoucineの阻害効果をELISA法とRI法で比較した結果を示す図である。

図12は、Cyclin/CDK活性に対する阻害剤Roscovitineの阻害効果をELISA法とRI法で比較した結果を示す図である。

図13は、Cyclin/CDK活性に対する阻害剤Olmoucine-isomerの阻害効果をELISA法とRI法で比較した結果を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

##### 〔実施例1〕 抗リン酸化ペプチド抗体の作製

###### (1) 免疫原の作製

###### (a) ペプチドの作製

リン酸化サイトとして報告されたヒトRBタンパク質の356位のスレオニン、612位のセリン、780位のセリン、807位のセリンをそれぞれ含む以下の8本のペプチドを、ペプチド合成機を用いて作製した。

phospho-pRB-T356 : SFETQRT(p)PRKSNL (配列番号: 1)

pRB-T356 : SFETQRTPRKSNL (配列番号: 2)

phospho-pBR-S612 : YLSPVRS(p)PKKGSC (配列番号: 3)

pRB-S612 : YLSPVRSPKKKGSC (配列番号: 4)

phospho-pRB-S780 : TRPPTLS(p)PIPHIPC (配列番号: 5)

pRB-S780 : TRPPTLSPIPHIPC (配列番号: 6)

phospho-pRB-S807 : GGNIYIS(p)PLKSPYKIC (配列番号: 7)

pRB-S807 : GGNIYISPLKSPYKIC (配列番号: 8)

上記アミノ酸配列は1文字表記で、アミノ末端からカルボキシル末端方向に記した。S(p)、T(p)はそれぞれリン酸化セリン残基、リン酸化スレオニン残基を示す。90%以上の純度であることをHPLCにより確認した。phospho-pRB-T356はヒトRBタンパク質の350番目から362番目までの、phospho-pBR-S612は606番目から618番目までの、phospho-pRB-S780は774番目から786番目までの、そしてphospho-pRB-S807は801番目から815番目までのアミノ酸配列に相当する。全てのペプチドのカルボキシル末端のシステイン残基は、ペプチドをキャリアタンパク質に共有結合させるために導入した。

(b) ペプチドのキャリアータンパク質への結合

免疫原とするために、リン酸化ペプチド (phospho-pRB-T356、-S612、-S780、および-S807) をそれぞれキャリアータンパク質であるキーホール・リンペット・ヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin (KLH)) と共有結合させた。これらのペプチドと KLH の結合には  $\omega$ -マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルクシニミドエステル ( $\omega$ -maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS)) を架橋物質として用いた。等量の KLH とペプチドを架橋した。このペプチド-KLH を免疫原として使用した。

(c) 免疫原の調製と免疫方法

キャリアータンパク質 KLH とそれに結合したペプチド (ペプチド-KLH)  $10\ \mu g$  ( $100\ \mu l$ ) をマウスの 1 回あたりの免疫原として用いた。 $1.5\ ml$  チューブで、 $100\ \mu l$  のフロイント完全アジュバントとペプチド-KLH (各  $100\ \mu l$ ) を  $1\ ml$  シリンジと 21 ゲージ注射針を用いて、完全にエマルジョン化するまで混合した。

マウス (Balb/c) に対し、腹腔に各リン酸化ペプチドとアジュバントのエマルジョンを 26 ゲージ注射針を使用して注射した。免疫は 1 週間ごとに 1 回、合計 4 回行った。4 回目の免疫の際、抗体力値をチェックするため、マウスの眼下静脈蒼より  $50\sim100\ \mu l$  採血し、ELISA 法により抗体力値を確認した。

(2) phospho-pRB-T356、phospho-pRB-S612、phospho-pRB-S780、および phospho-pRB-S807 に対するモノクローナル抗体の作成

(a) ハイブリドーマの作製

十分な抗体力値の確認後、マウスより脾臓を摘出し、ポリエチレングリコールを用いてミエローマ細胞と細胞融合させた。ハイブリドーマの選別は HAT (hypoxanthine, aminopurine, thymidine) セレクションで行った。ハイブリドーマの培養上清を用いた ELISA 法により、非リン酸化ペプチド (pRB-T356、pRB-S612、pRB-S780、pRB-S807) よりもリン酸化ペプチド (phospho-pBR-T356、

phospho-pRB-S612、phospho-pRB-S780、phospho-pRB-S807)に対して反応性の高いクローンのスクリーニングを行った。

#### (b) 腹水の取得と抗体の精製

限界希釈法により得られたハイブリドーマクローンを 75cm<sup>2</sup> フラスコで培養した後、マウスの腹腔に注射した。ハイブリドーマを注射する 10 日前に 1ml の、3 日前に 0.5 ml のプリスタン(Sigma)をマウスに注射しておいた。1～2 週間後にマウスの状態を見ながら腹水を採取した。腹水に終濃度 50 % になるように硫酸安を添加し、4℃で 1 時間以上攪拌した。高速遠心によりその沈殿を回収した。最小限の純水で沈殿を完全に溶解後、透析膜を用いて PBS に対して透析した。完全に PBS に平衡化させた後、protein A セファロース(ファルマシア社製)と複合体を形成させた。最後に protein A セファロースから抗体を溶出させた。

#### (3) 抗体力価および特異性の検定

ペプチドを 10 μg/ml になるように PBS に溶かし、ELISA 用マイクロタイヤー プレートに 1 ウェルあたり 50 μl づつ分注して、4℃で一晩感作した。感作後、ペプチド溶液を除き、1% BSA - 0.1% Tween 20-PBS を 1 ウェルあたり 200 μl づつ分注して、室温で 1 時間以上ブロッキングした。

精製した抗体を 0.1% Tween 20-PBS で必要に応じて希釈した。希釈したそれらのサンプルを感作プレート 1 ウェルあたり 100 μl 添加し、室温に 1 時間静置した(一次反応)。一次反応後、洗浄瓶を用いて、各ウェルを PBS で 4 回以上、十分に洗浄した。0.1% Tween 20-PBS で 3000 倍希釈した西洋ワサビ ペルオキシダーゼ(HRP)標識ヤギ抗マウス IgG (H+L)抗体(MBL 社製 330)を各ウェルに 100 μl づつ分注し、室温に 1 時間静置した(二次反応)。二次反応後同様に、PBS で洗浄した後、750 μM TMB (Tetramethylbenzidine) 溶液を 1 ウェルあたり 100 μl 添加し、30℃で 5～20 分間発色させた(発色反応)。1.5 N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>を 100 μl づつ加え発色反応を停止させ、マイクロタイヤー プレートリーダーを用いて、450 nm における吸光度を測定した。

〔実施例2〕 組み換えサイクリンD1／CDK4、サイクリンE／CDK2、サイクリンB／CDK1の作製

(1) PCR法によるサイクリン、CDKのcDNA単離

(a) 各サイクリン、CDK增幅用プライマーの設定

各サイクリン、CDKの全長cDNAを増幅するため、以下に示すプライマーを作製した。各サイクリンおよびCDKのcDNAの塩基配列は次のアクセッションナンバーでGenBankに登録されている。

サイクリンD1 : X59798

サイクリンE : M73812, M74093

サイクリンB : M25753

CDK1 : X05360

CDK2 : X61622, X62071

CDK4 : NM\_000075

＜サイクリンD1增幅用プライマー＞

フォワードプライマー(hcy-D1 F1) : 5'-ATA GGA TCC ATG GAA CAC CAG CTC CTG TGC-3' (配列番号: 9) (5'側3つの塩基(ATA)は制限酵素処理を円滑に行わせるためのもの。5'側4番目から9番目(GGA TCC)は制限酵素Bam HI サイト。)

リバースプライマー(hcy-D1 R1) : 5'-ATA CTC GAG GAT GTC CAC GCT CCG CAC GTC-3' (配列番号: 10) (5'側3つの塩基(ATA)は制限酵素処理を円滑に行わせるためのもの。5'側4番目から9番目(CTC GAG)は制限酵素XhoI サイト。)

＜サイクリンE增幅用プライマー＞

フォワードプライマー(hcy-E F1) : 5'-ATA AGA TCT ATG AAG GAG GAC GGC GGC GCG-3' (配列番号: 11) (5'側3つの塩基(ATA)は制限酵素処理を円滑に

行わせるためのもの。5'側4番目から9番目(AGA TCT)は制限酵素Bgl II サイト。)

リバースプライマー(hcy-E R1) : 5'-ATA CTC GAG CGC CAT TTC CCG CCC GCT GCT-3' (配列番号: 1 2) (5'側3つの塩基(ATA)は制限酵素処理を円滑に行わせるためのもの。5'側4番目から9番目(CTC GAG)は制限酵素Xho I サイト。)

#### <サイクリンB增幅用プライマー>

フォワードプライマー(hcy-B F1) : 5'-ATA GGA TCC ATG GCG CTC CGA GTC ACC AGG-3' (配列番号: 1 3) (5'側3つの塩基(ATA)は制限酵素処理を円滑に行わせるためのもの。5'側4番目から9番目(CTC GAG)は制限酵素Xho I サイト。)

リバースプライマー(hcy-B R1) : 5'-ATA CTC GAG CAC CTT TGC CAC AGC CTT GGC-3' (配列番号: 1 4) (5'側3つの塩基(ATA)は制限酵素処理を円滑に行わせるためのもの。5'側4番目から9番目(CTC GAG)は制限酵素Xho I サイト。)

#### <CDK1增幅用プライマー>

フォワードプライマー(hCDK1 F1) : 5'-ATA GGA TCC ATG GAA GAT TAT ACC AAA ATA-3' (配列番号: 1 5) (5'側3つの塩基(ATA)は制限酵素処理を円滑に行わせるためのもの。5'側4番目から9番目(GGA TCC)は制限酵素Bam HI サイト。)

リバースプライマー(hCDK1 R1) : 5'-ATA CTC GAG ACT CTT CTT AAT CTG ATT GTC-3' (配列番号: 1 6) (5'側3つの塩基(ATA)は制限酵素処理を円滑に行わせるためのもの。5'側4番目から9番目(CTC GAG)は制限酵素Xho I サイト。)

## &lt;CDK2增幅用プライマー&gt;

フォワードプライマー(hCDK2 F1) : 5'-ATA GGA TCC ATG GAG AAC TTC CAA AAG GTG-3' (配列番号: 17) (5'側3つの塩基(ATA)は制限酵素処理を円滑に行わせるためのもの。5'側4番目から9番目(GGA TCC)は制限酵素 Bam HI サイト。)

リバースプライマー(hCDK2 R1) : 5'-ATA CTC GAG TCA GAG TCG AAG ATG GGG TAC-3' (配列番号: 18) (5'側3つの塩基(ATA)は制限酵素処理を円滑に行わせるためのもの。5'側4番目から9番目(CTC GAG)は制限酵素 XhoI サイト。)

## &lt;CDK4增幅用プライマー&gt;

フォワードプライマー(hCDK4 F1) : 5'-CAT GGA TCC ATG GCT ACC TCT CGA TAT GAG-3' (配列番号: 19) (5'側3つの塩基(CAT)は制限酵素処理を円滑に行わせるためのもの。5'側4番目から9番目(GGA TCC)は制限酵素 BamHI サイト。)

リバースプライマー(hCDK4 R1) : 5'-CAT GTC GAC CTC CGG ATT ACC TTC ATC CTT-3' (配列番号: 20) (5'側3つの塩基(CAT)は制限酵素処理を円滑に行わせるためのもの。5'側4番目から9番目(GTC GAC)は制限酵素 SalI サイト。)

## (b) 鑄型DNAの調製

サイクリン、CDKの全長cDNAをPCR法で増幅するための鑄型として、ヒト乳癌由来のZR75-1細胞のcDNAを用いた。まず、cDNAを作製するため、ZR75-1細胞よりフェノールーチオシアニン酸グアニジン法(ニッポンジーン、ISogen)を用いて全RNAを抽出、精製した。抽出した全RNAを基にオリゴdTまたはオリゴランダムプライマーを用いてcDNAを合成した(逆転写反応)。

## (c) PCR反応の条件

P C R 反応は以下の 3 段階の条件で行った。

1 ; 95°C 5 分間 (変性) 、 52°C 1 分間 (アニール) 、 72°C 2 分間 (伸長) を 1 サイクル

2 ; 94°C 30 秒間 (変性) 、 62°C 30 秒間 (アニール) 、 72°C 2 分間 (伸長) を 35 サイクル

3 ; 72°C 10 分間を 1 サイクル

(d) ベクターへのクローニングと組み換えバキュロウイルス液の調製

増幅された各 P C R 産物をそれぞれ対応する制限酵素で消化した。制限酵素消化 DNA をアガロースゲルで電気泳動した後、Geneclean (BI0101 社製) で精製した。精製 DNA を予め P C R 産物の両末端と同じ制限酵素により消化した pFASTBACHT ベクター (GIBCO BRL 社製) ヘライゲーションした後、「Molecular Cloning (Sambrook et al., 第二版 (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)」の方法に従って大腸菌 (DH 5  $\alpha$ ) 株を形質転換し、複数のシングルコロニーを取得した。シングルコロニーから採取した、精製した pFASTBACHT ベクター (pFASTBAC-n6his-hcyD, pFASTBAC-n6his-hcyE, pFASTBAC-n6his-hcyB, pFASTBAC-n6his-hCDK1, pFASTBAC-n6his-hCDK2, pFASTBAC-n6his-hCDK4) を大腸菌 (DH10BAC 株) ヘトランスフォーメーションし、Luria 寒天プレート (10g/L ペプトン、5g/L 酵母抽出物、10g/L NaCl、12g/L 寒天、200  $\mu$ g/ml X-Gal、40  $\mu$ g/ml IPTG、10  $\mu$ g/ml テトラサイクリン、7  $\mu$ g/ml ゲンタマイシン、50  $\mu$ g/ml カナマイシン) 上で生育させた。DH10BAC 内では、部位特異的トランスポジションによって、pFASTBACHT 内の発現カセットがバクミド DNA へ転移する。転移の起きたシングルの白いコロニーから組み換えバクミド DNA を精製した。組み換えバクミド DNA を CELL FECTIN (GIBCO BRL) を用いて Sf9 細胞のトランسفエクションを行った。組み換えバキュロウイルスは培養液中に産出されるので、約 1 週間後に培養液を遠心分離し、その上清をウイルス液

とした。以上の操作は基本的に BAC-TO-BAC Baculovirus Expression System (GIBCO BRL 社製)により行った。

(e) 塩基配列の確認

「Molecular Cloning (前記)」の方法に従い、pFASTBAC-n6his-hcyD、pFASTBAC-n6his-hcyE、pFASTBAC-n6his-hcyB、pFASTBAC-n6his-hCDK1、pFASTBAC-n6his-hCDK2、pFASTBAC-n6his-hCDK4)を精製した。それらのインサート DNA の塩基配列の決定をサンガー法に基づき、オートシーケンサーで行った。インサート DNA の配列とデータベース上に公開されている配列を比較し、クローニングされた cDNA がそれぞれ、サイクリンD1、サイクリンB、サイクリンE、CDK1、CDK2、CDK4であることを確認した。

(f) 組み換えタンパク質の精製

Sf9 細胞を 75cm<sup>2</sup>のフラスコにほぼコンフルエントな状態にまで培養し、その培養液に組み換えバキュロウイルス液を加えた。感染後 3～4 日目に細胞を氷冷 PBS に懸濁し、遠心洗浄を行った。細胞を HGN バッファー(-DTT)に懸濁し、氷冷しながら超音波処理を行った。続いて遠心分離を行い、得られた上清を可溶性画分とし精製に用いた。pFASTBACHT ベクターの発現カセットではN末端側に 6 つの His 残基(6xHis)が付加される。抽出液の一部を用いてウエスタンプロットを行った後、抗 5xHis 抗体(GIAGEN 社製)によりタンパク質の発現を確認した。可溶性分画を Ni-キレーティングセファロースカラム(Pharmacia 社製)に通し、6xHis-Tag を介して組換えタンパク質をカラムに吸着させた。6xHis-Tag は Ni<sup>2+</sup>と錯体を形成するため、カラムの Ni<sup>2+</sup>に組み換えタンパク質が吸着する。カラムを HGN バッファー(-DTT)で洗浄した後、組み換えタンパク質をエリューションバッファー(50mM～1 M イミダゾール、0.5 M NaCl、20mM Tris-HCl pH7.9)で溶出した。その際のイミダゾールの濃度は、10mM、25mM、50mM、100mM、250mM、500mM、1M と段階的に変化させて溶出を行った。

各イミダゾール画分について、ウエスタンプロットで抗 5xHis 抗体により検出される組み換えタンパク質が存在する画分を透析液(50mM HEPES (pH7.5)、1mM DTT、1mM EDTA (pH8.0)、50%グリセロール)に対して一晩透析した。

透析後のサンプルを MonoQ カラム (Pharmacia 社製) に通した。FPLC (Pharmacia 社製) を用いて吸着されたタンパク質を、0~1M NaCl を含む 10mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM DTT、10%グリセロールで濃度勾配をかけながら溶出させた。ウエスタンプロットで抗 5xHis 抗体により検出された組み換えタンパク質が存在する画分について透析液に対して透析を行った。

〔実施例 3〕 ELISA によるサイクリンD1/CDK4、サイクリンE/CDK2、サイクリンB/CDK1 活性測定系

(1) 活性測定用基質の作製

サイクリン/CDK 複合体の基質として様々な分子が知られているが発癌との関係で最も興味深いRBタンパク質を基質として選択した。ヒトRBタンパク質のアミノ酸配列 307aa-405aa、540aa-645aa、および 723aa-833aa をコードする cDNA 配列を、発現ベクター pGEX に組み込み、大腸菌内でグルタチオン-s-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現させた。発現させたそれぞれの産物を、アミノ酸配列順に GST-pRB1、GST-pRB2、GST-pRB3 と名付けた。

pGEX ベクターでは、組み換えタンパク質は、GST との融合タンパク質として作られる。この GST 酵素がグルタチオン (GSH) に対してアフィニティーを持っていることをを利用して、組み換えタンパク質の精製を行った。組み換えタンパク質の発現を確認した後、その菌体を 1%Tween20-PBS に懸濁後、超音波処理により菌体を破碎した。高速遠心後、上清を組み換えタンパク質を含む可溶性分画とした。この可溶性分画を GSH-セファロース 4 B カラム (Pharmacia 社製) に通し、GST-p53(1-99) タンパク質をカラムに吸着させた。カラムを WE バッファー (10mM 2-メルカプトエタノール、2mM MgCl<sub>2</sub>、20mM Tris-HCl pH7.5) で洗浄後、組み換えタンパク質を G バッファー (10mM GSH、50mM Tris-HCl pH9.6) を用いて溶出した。

溶出された各発現蛋白は 50mM Tris-HCl (pH 8.0)、50%グリセリンに対して透析した。

#### (2) 基質感作プレートの作製

GST-pRB1、GST-pRB2、GST-pRB3 を 20  $\mu$ g/ml になるように PBS で希釈し、ELISA 用マイクロタイタープレートに 1 ウェルあたり 50  $\mu$ l づつ分注して、4℃ で一晩感作した。感作後、1%BSA-0.1% Tween20-PBS を 1 ウェルあたり 200  $\mu$ l ずつ分注し、室温で 1 時間以上ブロッキングを行った。

#### (3) リン酸化反応

サイクリン／CDK用反応バッファー (50mM HEPES、15mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT、0.02% Triton X、1mM EGTA、5mM ATP) 中に各酵素(組み換えサイクリンD1／CDK4、サイクリンE／CDK2、サイクリンB／CDK1)を 1 アッセイあたり約 100ng となるように加え固相プレートに分注 (50  $\mu$ l/ウェル)。30℃で 1 時間、インキュベーションした。

#### (4) 抗原抗体反応

一次反応： PBS で 5 回洗浄後、各 50 倍希釈した抗リン酸化モノクローナル抗体 T356 (1C2)、S612 (3C12)、S780 (2C4)、S812 (5H12) をウェルあたり 100  $\mu$ l ずつ分注し、室温で 1 時間インキュベーションした。

二次反応： PBS で 1.0 回洗浄後、40000 倍希釈した HRP 標識抗マウス IgG (Immunotech 社製) をウェルあたり 100  $\mu$ l ずつ分注し、室温で 1 時間インキュベーションした。

発色： PBS で 5 回洗浄後、TMB (Tetramethylbenzidine) をウェルあたり 100  $\mu$ l ずつ分注し、室温で 30 分間発色させた後、1.5N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> をウェルあたり 100  $\mu$ l ずつ分注し反応を停止させた。

#### (5) 測定結果

表 2 で示すように、発現させた各サイクリン／CDK複合体の活性を感度よく検出することが可能であった。

表 2

| 基質      | GST-pRB1 | GST-pRB2 | GST-pRB3 | GST-pRB3 |
|---------|----------|----------|----------|----------|
| 抗体      | T356     | S612     | S780     | S807     |
| 複合体     |          |          |          |          |
| D1/CDK4 | 0.482    | 1.184    | 1.076    | 0.441    |
| E/CDK2  | 2.301    | 1.354    | 0.092    | 0.482    |
| B/CDK1  | 1.713    | 1.412    | 0.199    | 0.740    |
| 酵素なし    | 0.030    | 0.074    | 0.076    | 0.052    |

## 〔実施例4〕 Cyclin D1/CDK 阻害剤スクリーニングシステムの構築

## &lt;ELISA法&gt;

## 1) 抗体感作条件

抗リン酸化 RB モノクロナル抗体には、クローン 1C12 (Thr356 特異的)、クローン 4E4 (Ser612 特異的)、クローン 2C4 (Ser780 特異的) を用いた。各抗リン酸化 RB 抗体を PBS で 10  $\mu$ g/ml に希釈し、マイクロプレート各ウェルに 100  $\mu$ l づつ添加し、4°Cで 15 時間インキュベーションした。抗体溶液を振り払った後、2.5% BSA を含む PBS (5% sucrose, 0.1%NaN3) 中で、4°C、24 時間ブロッキングした。風乾の後測定に供した。

## 2) リン酸化反応

基質には、RB アミノ酸配列 301aa-928aa を大腸菌内で GST fusion 蛋白として発現させ、グルタチオンセファロース、フォスフォセルロース (P11) を用いて精製したものを用いた (RB301)。Cyclin/CDK には、Cyclin D1/CDK4、Cyclin A/CDK2、Cyclin E/CDK2、Cyclin B/CDK1 各々バキュロバクテリスを用いて、sf9 内で発現させ、コバルトカラム、フォスフォセルロース (P11) を用いて精製したものを用いた。

リン酸化バッファー (50mM HEPES, 0.05% triton X, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM EGTA, 200 μg/ml BSA) に RB301 (10 μg/ml)、100 μM ATP、Cyclin/CDK を添加し (最終容量 180 μl) 、30℃で 30 分反応させた後、PBS (10%スキムミルク、350mM NaCl, 50mM EDTA) を各アッセイあたり 180 μl 加えて反応を停止させた。

### 3) 反応

リン酸化反応終了後、反応液を 100 μl づつ抗体感作プレートに添加し、室温で 1 時間インキュベーションした (一次反応)。洗浄ビンで 5 回洗浄 (洗浄液／PBS (500mM NaCl, 0.1% Tween20) の後、0.5 μg/ml 抗-GST ポリクロナル抗体をマイクロプレートの各ウェルに 100 μl づつ添加し、室温で 1 時間インキュベーションした (二次反応)。洗浄ビンで 5 回洗浄 (洗浄液／PBS (500mM NaCl, 0.1% Tween20) の後、20000 倍希釈 HRP 標識抗ラビット IgG 抗体をマイクロプレートの各ウェルに 100 μl づつ添加し、室温で 30 分インキュベーションした (三次反応)。その後、TMB (Tetramethylbenzidine) を用いて、室温で 30 分発色させた (発色反応)。

### <RI 法>

上記 ELISA 法と同様に 0.3 μci γ-<sup>32</sup>P-ATP によるリン酸化反応を行った後、10%TCA、0.2%ピロリン酸ナトリウムで反応を停止させた。不溶化した基質をグラスフィルターに吸着させ、2%TCA、0.02%ピロリン酸ナトリウムで洗浄の後、放射線量をカウントした。

図 1 に ELISA 法によるリン酸化反応測定結果について示す。いずれの酵素、リン酸化サイトの組み合わせにおいても、酵素の量に依存した OD 値を上昇を認め、その反応曲線はなめらかなシグモイドカーブを描いた。このことから、本発明で構築した ELISA 系は、Cyclin/CDK のリン酸化活性を良好に測定できるものと考えられた。精製した 4 種類の酵素の間で、各サイトに対するリン酸化活性を比較

すると、酵素によってリン酸化サイトに対する選択性のあることが示された。Cyclin A/CDK2, Cyclin E/CDK2 は Thr356, Ser612 に、Cyclin D1/CDK4 は Ser780 に選択性がみられた。また、Cyclin B/CDK1 は Ser612 に選択性がみられた。RI 法との間で、感度の比較を行ったところ、RI 法と同等以上であることが示された（図 10）。特に、Cyclin A/CDK2, Cyclin E/CDK2 においては ELISA 法は RI 法に比較して、10 倍程度感度が高いものと考えられた。

次に本 ELISA 系を用いて、阻害剤の阻害効果の判定が可能であるかどうか市販の薬剤を使って検討した。

薬剤としては、cdc2, cdk2 選択的阻害剤である Olomoucine (IC50=7  $\mu$ M)、Roscovitine (IC50=700nM)、リン酸化酵素全般的な阻害剤である K252a (PKC に対する  $K_i=25$ nM)、MEK に対する阻害剤 U0126 (IC50=55nM/ cdk2, 4 に対しては >10  $\mu$ M)、Olomoucine-isomer (Olomoucine に対する陰性コントロール) の 5 種類を使用した。

図 2～図 5 に K252a、Olomoucine、Roscovitine の阻害効果について ELISA 法で検討した結果を示した。いずれの阻害剤を用いた場合においても阻害剤添加濃度依存的に OD 値の低下をみた。Olomoucine、Roscovitine の IC50 は公示の値ではそれぞれ 7  $\mu$ M、700nM であるが、本発明における検討では、この値より 10 倍近く高くなつた。

これは、これら阻害剤が ATP 拮抗剤であるため、アッセイ系に用いる ATP 濃度によって値が異なるためと考えられる。論文上の報告 (Inhibition of cyclin-dependent kinases by prine analogues. Vesely J., Havliek L., Stnád M., BlouJJ., Donella-Deana A., Pinna L., Letham DS., Kato J., Detivaud L., Lelerc S., et al. Eur. J. Biochem. 1994 Sep. 1 224:2 771-86) では、ATP の濃度が 15  $\mu$ M、使用している基質が histoneH1 であるのに対し、本発明において検討した ELISA 系では ATP 濃度が 100  $\mu$ M、基質が RB であることも原因ではないかと考えられる。

また Olomoucine、Roscovitine は cdc2、cdk2 選択的阻害剤で、cdk4 に対しては阻害効果が著しく弱いことが報告されている (Biochemical and cellular effect of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. Meijer L., Borgne A., Mulner O., Chong JP., Blow JJ., Inagaki M., Delcros JG., Moulioux JP., Eur J. Biochem. 1997 Jan 15 243:1 -2 527-39)。本発明における検討結果はこの報告を反映したものとなった (Cyclin D1/CDK4 に対する阻害効果は他の 3 種類に比べて低い)。また、阻害効果の期待できない Olomoucine-isomer、U0126 においては、検討した濃度の範囲内では、ほとんど、OD 値の低下はみられなかった (図 6 ~ 図 9)。

さらに、RI 法と同様な阻害効果の判定が可能かどうか、Olomoucine、Roscovitine、Olomoucine-isomer を用いて、ELISA 法と、RI 法の間で阻害効果の判定について比較したところ、図 11 ~ 13 に示すように、ほぼ同様の阻害曲線を得ることができた。

以上のことから、本発明で構築した ELISA のシステムは、阻害剤のスクリーニング方法として有用であることが裏付けられた。

### 産業上の利用の可能性

実施例に示したように、抗リン酸化ペプチド特異抗体を用いた ELISA 法によって、サイクリンD1/CDK4、サイクリンE/CDK2、サイクリンB/CDK1 の酵素活性を測定することができた。これまでこれら酵素の活性測定では、RIA である  $^{32}P$  で標識された  $\gamma$ - $^{32}P$ -ATP を用いるために、廃液の処理といった手続きや特別な施設等を必要とした。これに対して本発明による測定方法では RIA を使用せず、しかも十分な感度を持った測定方法を実現することができる。加えて本発明は、リン酸化部位を特異的に認識する抗体の利用により、複数種のサイ

クリン／CDK複合体が共存する試料に含まれる、特定の複合体の活性のみを特異的に測定することを可能とした。

またこの測定方法をサイクリン／CDK複合体の活性調整剤のスクリーニング方法に応用すれば、簡便で迅速なスクリーニングを通常の実験室で行うことが可能である。更に、本発明に基づくスクリーニング方法は、各種の化学合成物質、細胞や細菌の抽出液、あるいは培養上清のような、幅広い候補化合物に対して適用することができる。したがって、本発明のスクリーニング方法は、サイクリン／CDK複合体の酵素活性を調整する化合物のスクリーニングにおいて、きわめて有用である。

## 請求の範囲

1. 次の工程を含む、試料中のサイクリン／CDK複合体の、RBタンパク質またはその部分ペプチドに対するリン酸化酵素活性の測定方法。
  - (a) RBタンパク質基質と試料とを、リン酸化酵素によるリン酸化反応に必要な条件下で接触させる工程
  - (b) RBタンパク質基質のリン酸化レベルの変化を、前記基質のリン酸化状態を識別しうる抗体との反応性の変化に基づいて検出する工程
2. 以下の工程を含む、サイクリン／CDK複合体の、RBタンパク質に対するリン酸化酵素活性を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニング方法。
  - (a) サイクリン／CDK複合体、およびRBタンパク質基質とを、被検化合物の存在下、リン酸化反応に必要な条件下で接触させインキュベートする工程
  - (b) RBタンパク質基質のリン酸化レベルの変化を、前記基質のリン酸化状態を識別しうる抗体との反応性の変化に基づいて検出する工程
  - (c) 被検化合物の非存在下における基質のリン酸化のレベルと比較して、基質のリン酸化のレベルの変化を低下もしくは上昇させる化合物を選択する工程
3. 以下の工程を含む、試料中のリン酸化されたRBタンパク質に対する脱リン酸化酵素活性の測定方法であって、前記リン酸化されたRBタンパク質が、サイクリン／CDK複合体によってリン酸化されたものである方法。
  - (a) リン酸化されたRBタンパク質基質と試料とを、脱リン酸化反応に必要な条件下で接触させインキュベートする工程
  - (b) RBタンパク質基質のリン酸化レベルの変化を、前記基質のリン酸化状態を識別しうる抗体との反応性の変化に基づいて検出する工程
4. 以下の工程を含む、リン酸化されたRBタンパク質に対する脱リン酸化酵素活性を阻害もしくは促進する化合物のスクリーニング方法。

(a) 前記リン酸化されたRBタンパク質に対する脱リン酸化酵素、およびリン酸化されたRBタンパク質基質を、被検化合物の存在下、脱リン酸化反応に必要な条件下で接触させインキュベートする工程

(b) RBタンパク質基質の脱リン酸化レベルの変化を、前記基質のリン酸化状態を識別しうる抗体との反応性の変化に基づいて検出する工程

(c) 被検化合物の被存在下における基質の脱リン酸化のレベルと比較して、基質の脱リン酸化レベルの変化を低下もしくは増加させる化合物を選択する工程

5. サイクリンが、サイクリンA、サイクリンB、サイクリンD1、サイクリンD2、サイクリンD3、およびサイクリンEで構成される群から選択されるいづれかのサイクリンである、請求項1-4のいづれかに記載の測定方法。

6. CDKが、CDK1、CDK2、CDK4、およびCDK6で構成される群から選択されるいづれかのCDKである、請求項1-4のいづれかに記載の測定方法。

7. サイクリン/CDK複合体が、以下の群から選択されるいづれかの組み合せからなる請求項1-4のいづれかに記載の測定方法。

サイクリンA/CDK1、

サイクリンA/CDK2、

サイクリンB/CDK1、

サイクリンD1/CDK4、

サイクリンD1/CDK6、

サイクリンD2/CDK4、

サイクリンD2/CDK6、

サイクリンD3/CDK4、

サイクリンD3/CDK6、および

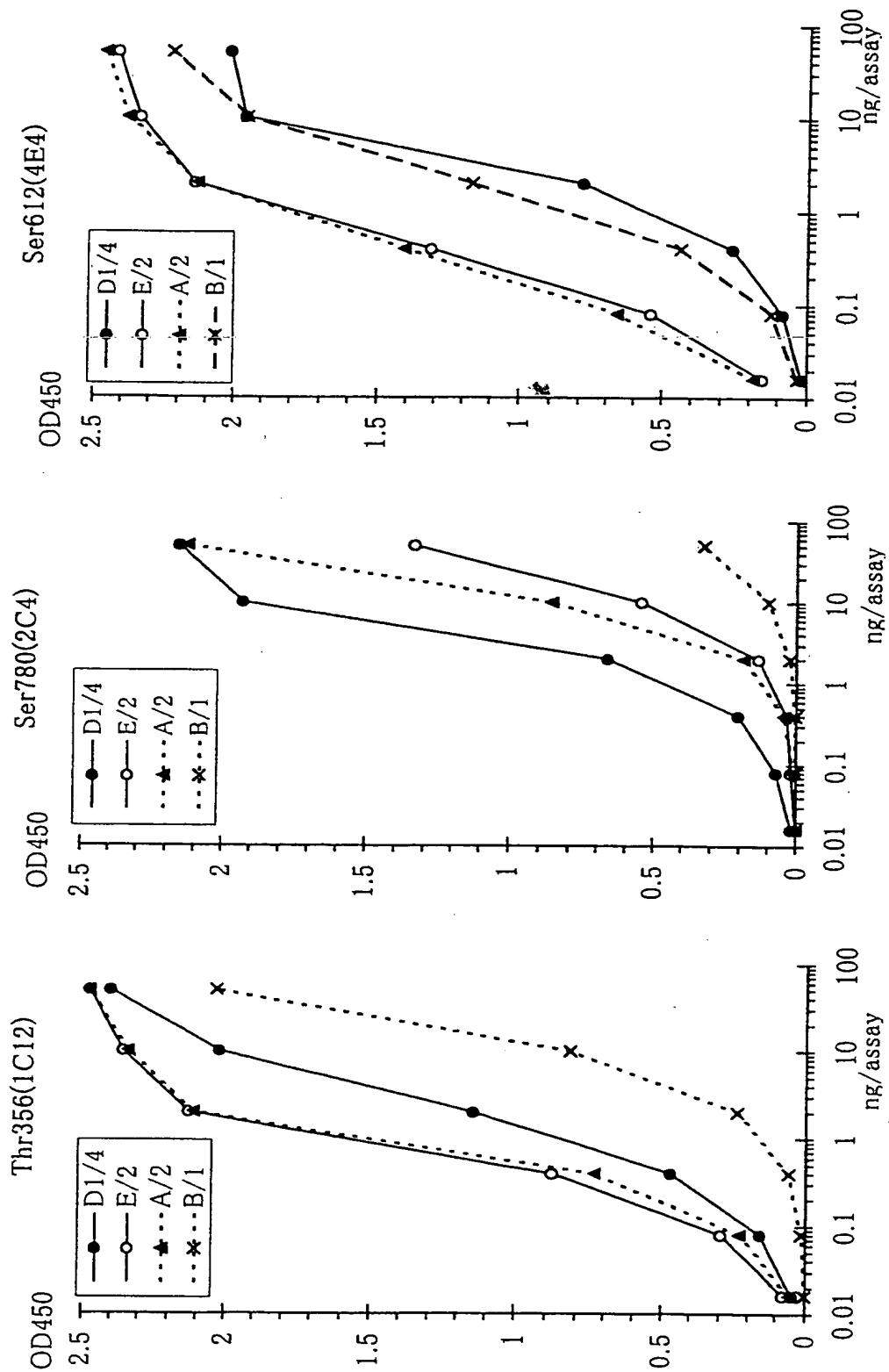
サイクリンE/CDK2

8. リン酸化酵素がサイクリンD1／CDK4であり、抗体がRBタンパク質の780位セリンのリン酸化状態を識別しうるものである請求項7に記載の方法。
9. リン酸化状態を識別することができる抗体が、そのリン酸化部位を識別しうるものであり、異なる部位をリン酸化する複数のサイクリン／CDK複合体が共存する試料に含まれるサイクリン／CDK複合体の活性を個別に測定する請求項1に記載の方法。
10. 抗体が、リン酸化されていないRBタンパク質基質よりも、リン酸化されたRBタンパク質基質との反応性が高いものである請求項1－4のいずれかに記載の方法。
11. 抗体が、リン酸化されたRBタンパク質基質よりも、リン酸化されていないRBタンパク質基質との反応性が高いものである請求項1－4のいずれかに記載の方法。
12. RBタンパク質基質が標識されている、請求項1－4のいずれかに記載の方法。
13. RBタンパク質基質が固相化されている、請求項1－4のいずれかに記載の方法。
14. 抗体が標識されている、請求項1－4のいずれかに記載の方法。
15. RBタンパク質基質のリン酸化レベルの評価をELISA法により行う、請求項1－4のいずれかに記載の方法。
16. 請求項2に記載のスクリーニング方法により単離することができる化合物を主成分として含む、サイクリン／CDK複合体のタンパク質リン酸化酵素の活性調整剤。
17. 請求項4に記載のスクリーニング方法により単離することができる化合物を主成分として含む、サイクリン／CDK複合体のタンパク質リン酸化酵素によってリン酸化されたタンパク質に対する脱リン酸化酵素の活性調整剤。
18. 天然由来である、請求項16または17のいずれかに記載の活性調整剤。

19. RBタンパク質、またはヒト以外の種におけるそのホモログの被リン酸化部位を含むアミノ酸配列からなるペプチドを含む、請求項1-4のいずれかに記載の方法に用いるための抗体作成用免疫原。
20. 被リン酸化部位がリン酸化されている請求項19に記載の免疫原。
21. 被リン酸化部位が、ヒトRBタンパク質における356位のスレオニン、612位のセリン、780位のセリン、および807位のスレオニンからなる群から選択される少なくとも1つである請求項19または20のいずれかに記載の免疫原。
22. 被リン酸化部位が、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6、および配列番号：8のいずれかからなるアミノ酸配列から選択される請求項21に記載の免疫原。
23. RBタンパク質基質のリン酸化状態を識別する抗体を含む、請求項1-4に記載のいずれかの方法のためのキット。

1 / 1 3

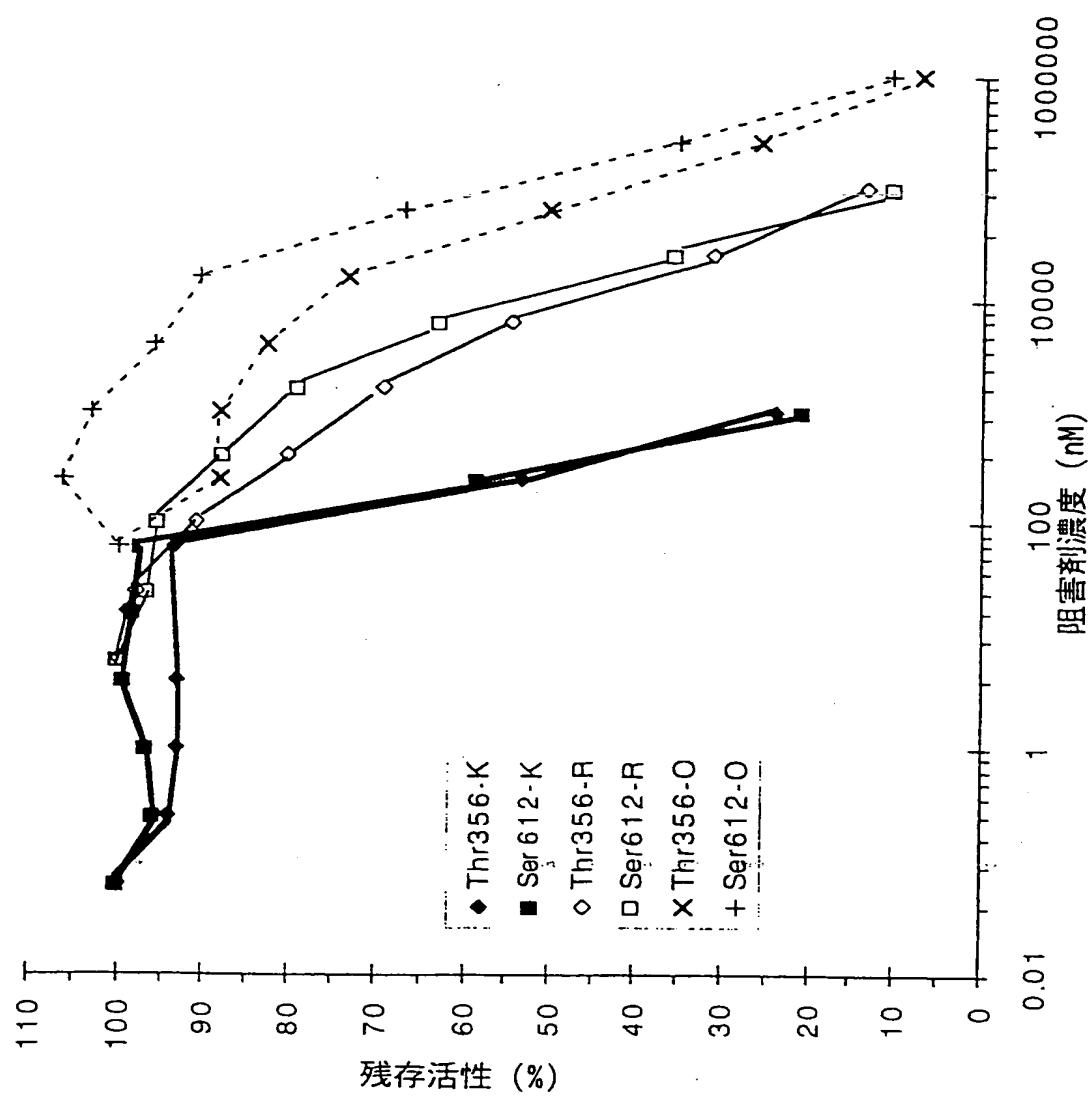
図 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 13

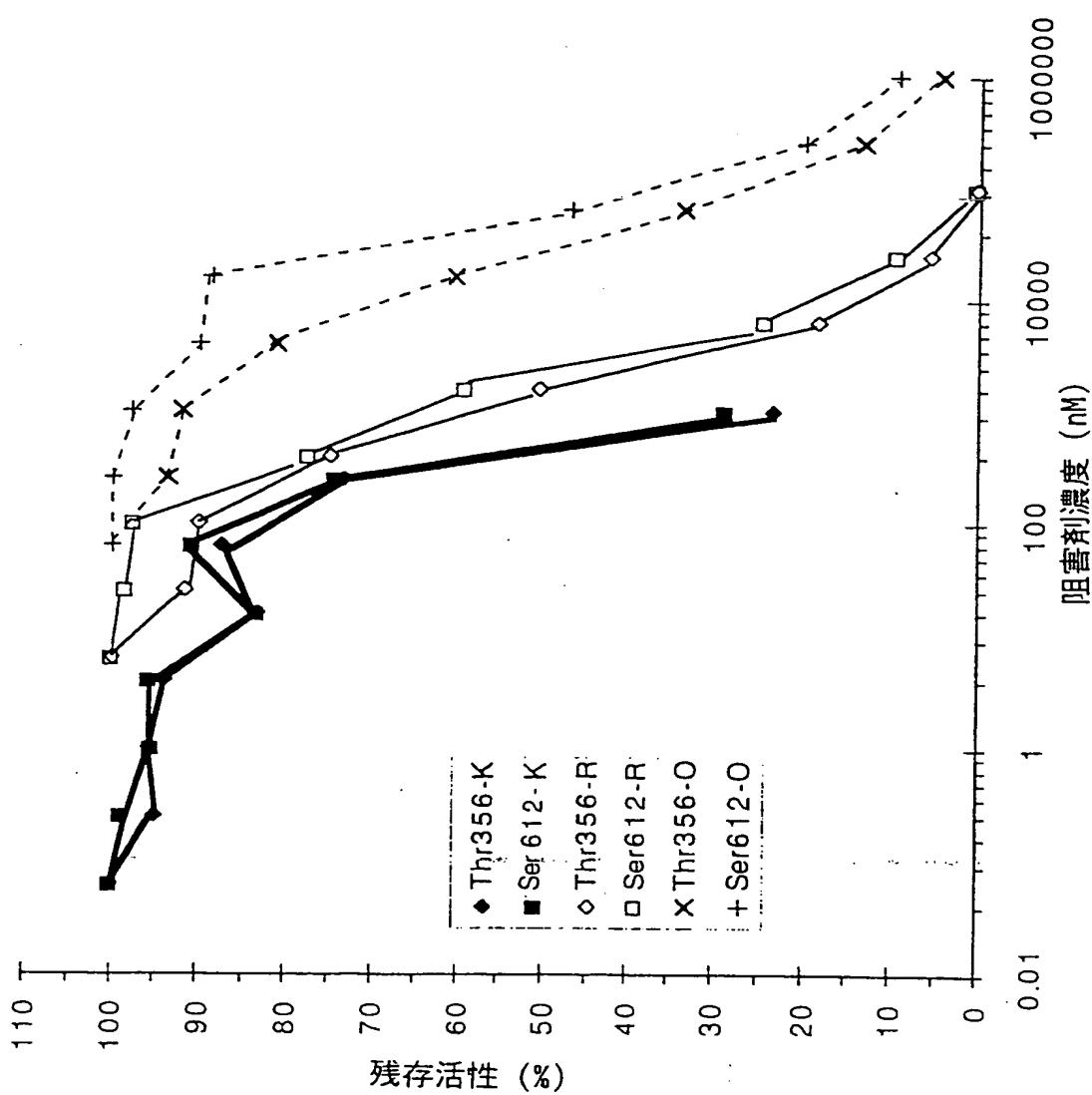
図 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 / 13

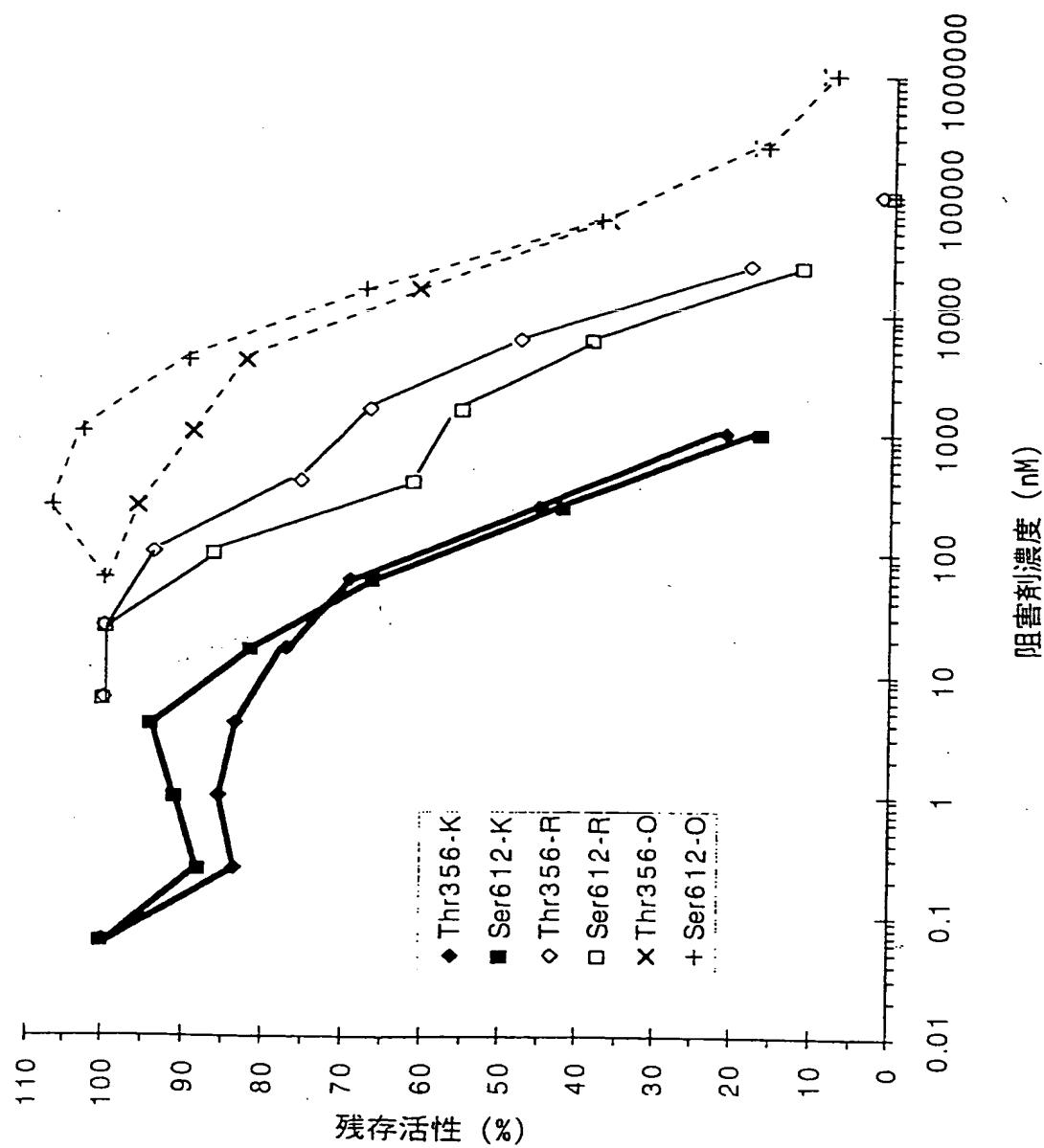
図3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

4 / 13

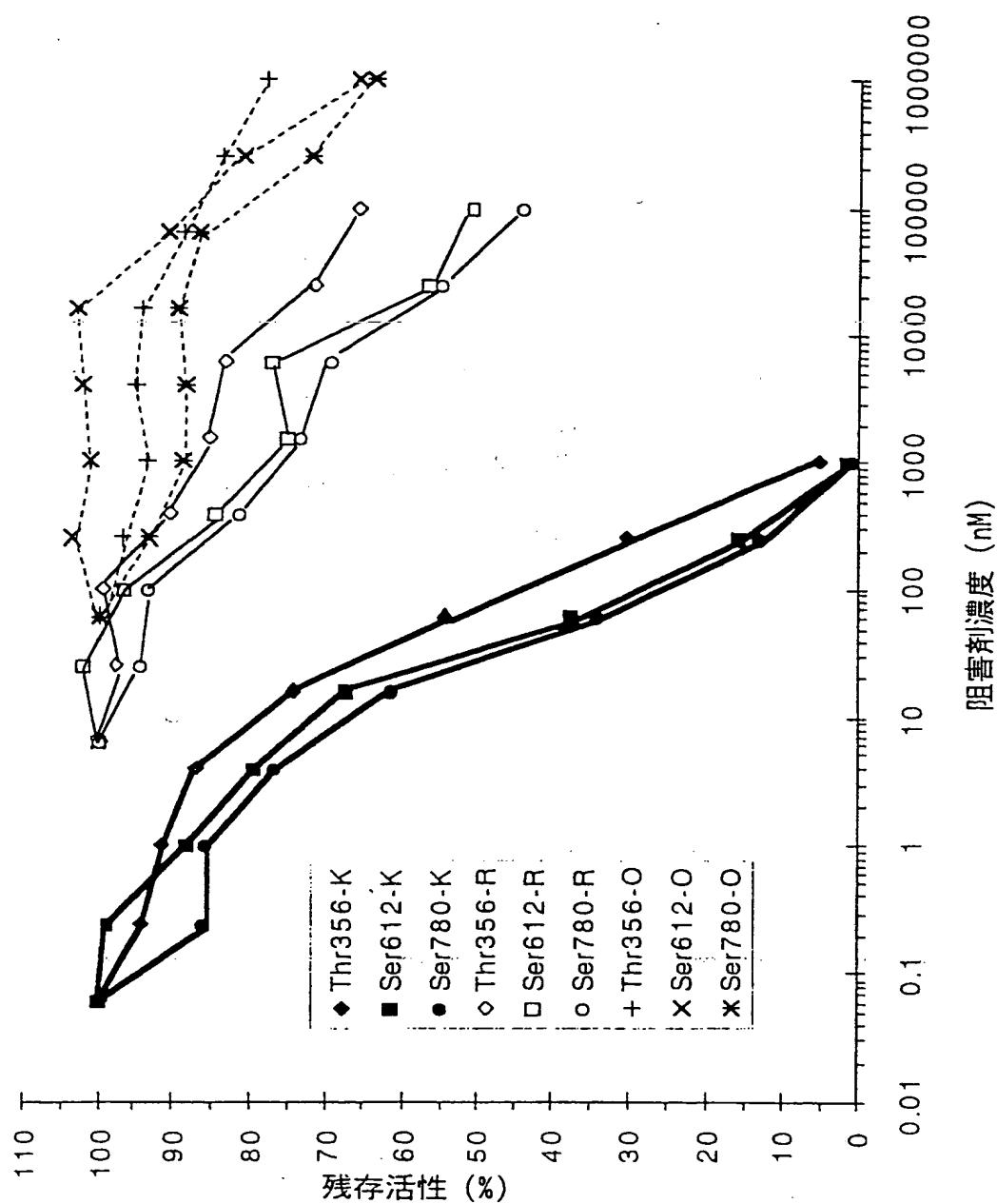
図4



THIS PAGE BLANK (USPTO)

5 / 13

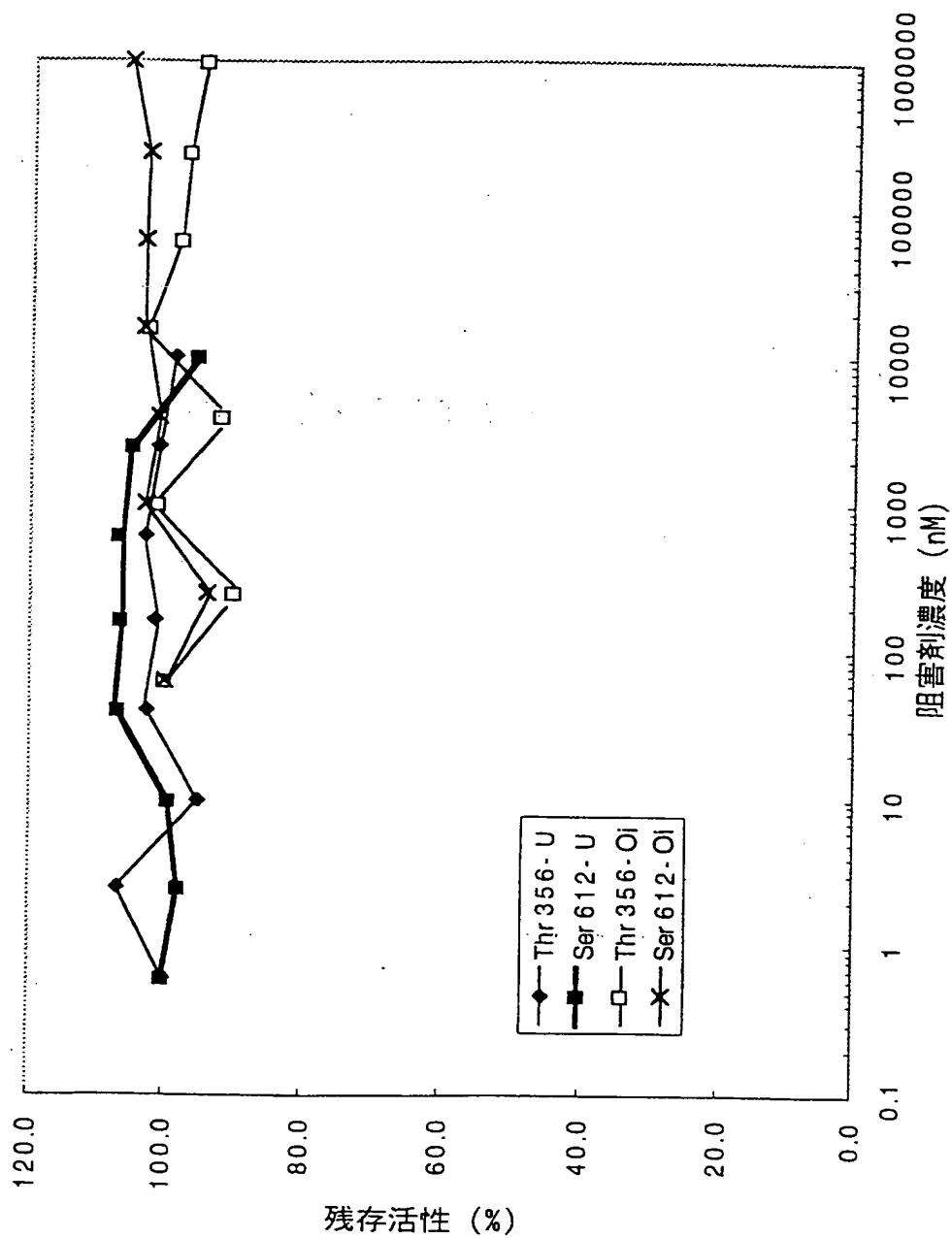
図 5



THIS PAGE BLANK (USPTO)

6 / 13

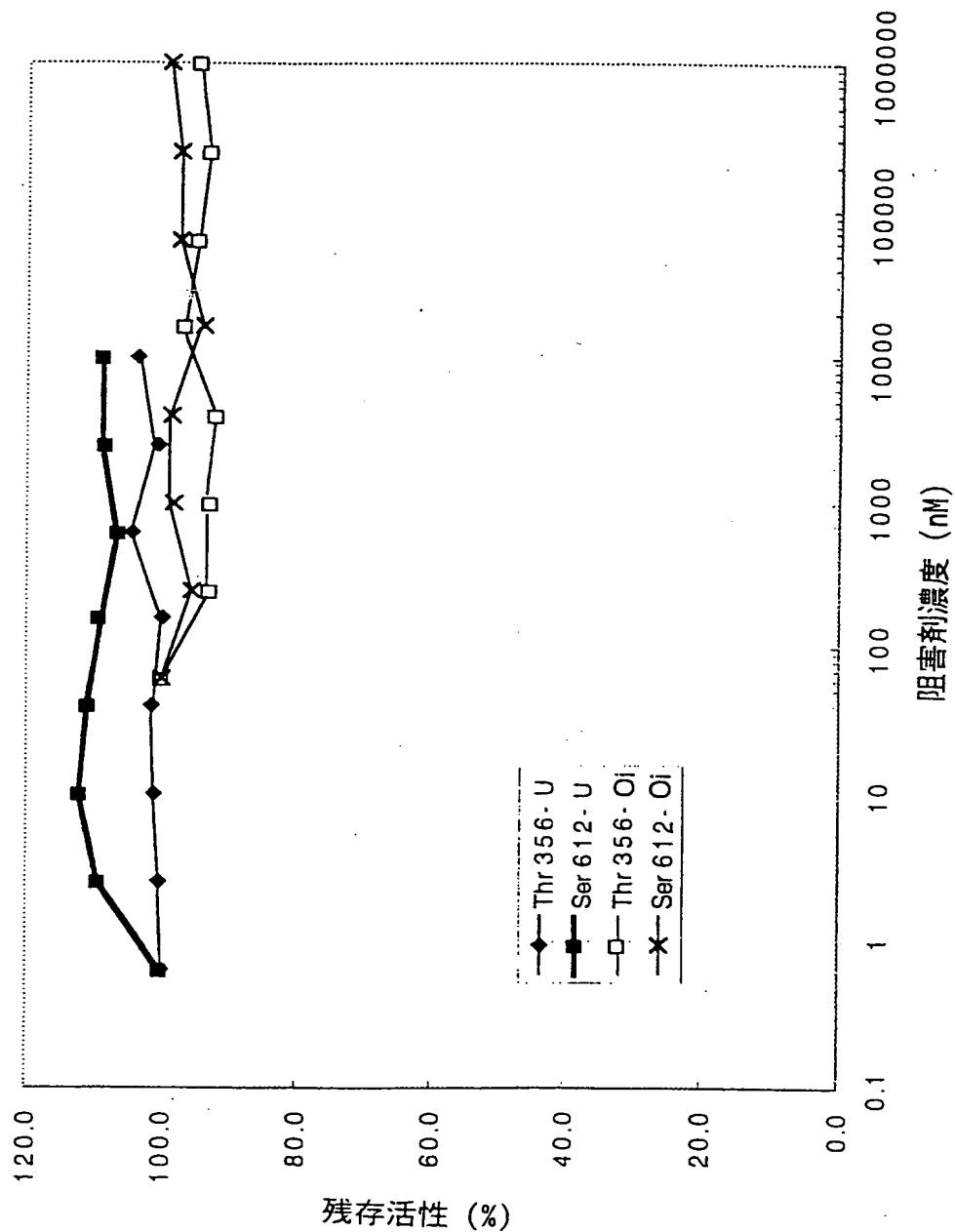
図 6



THIS PAGE BLANK (USPTO)

7 / 13

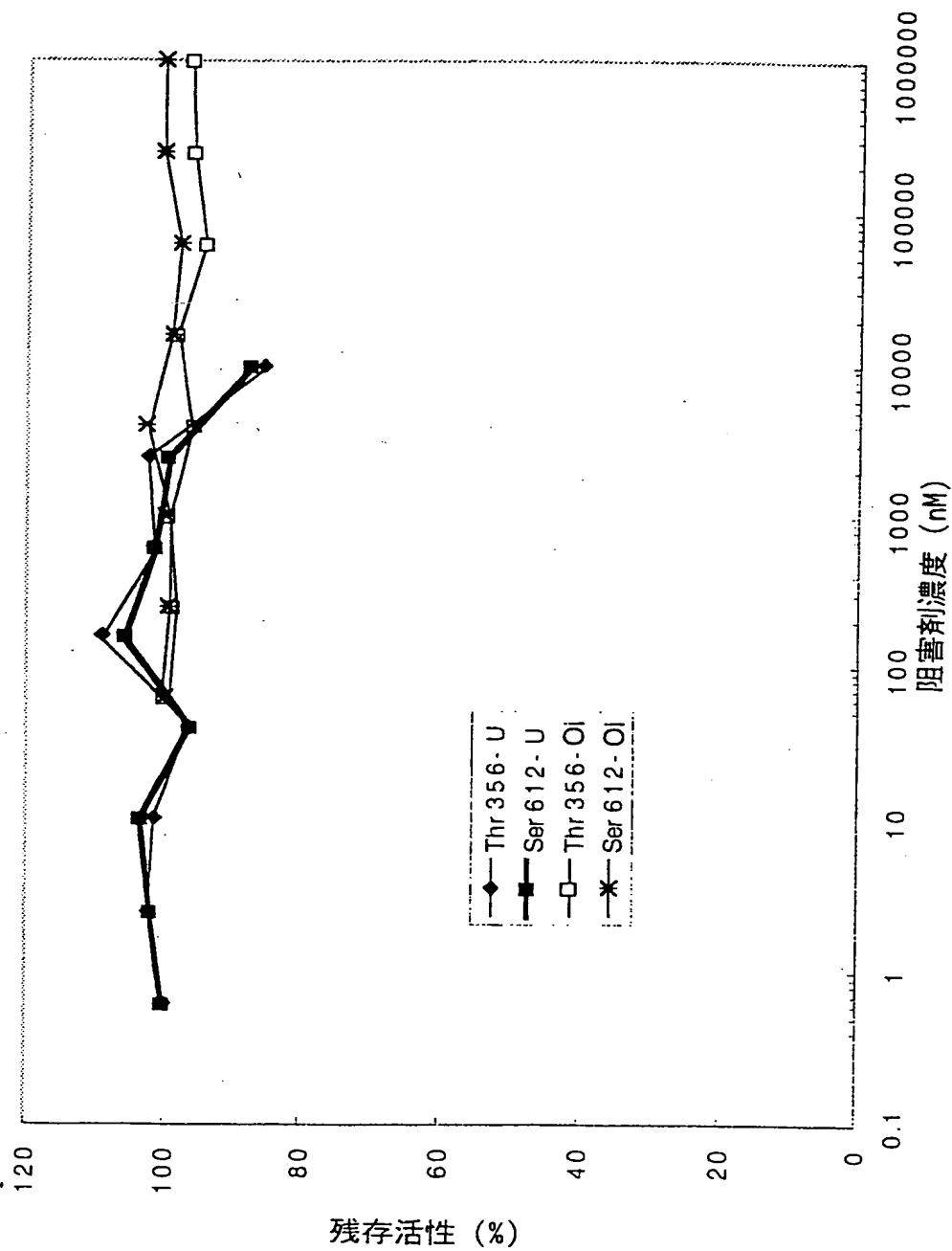
図7



THIS PAGE BLANK (USPTO)

8 / 13

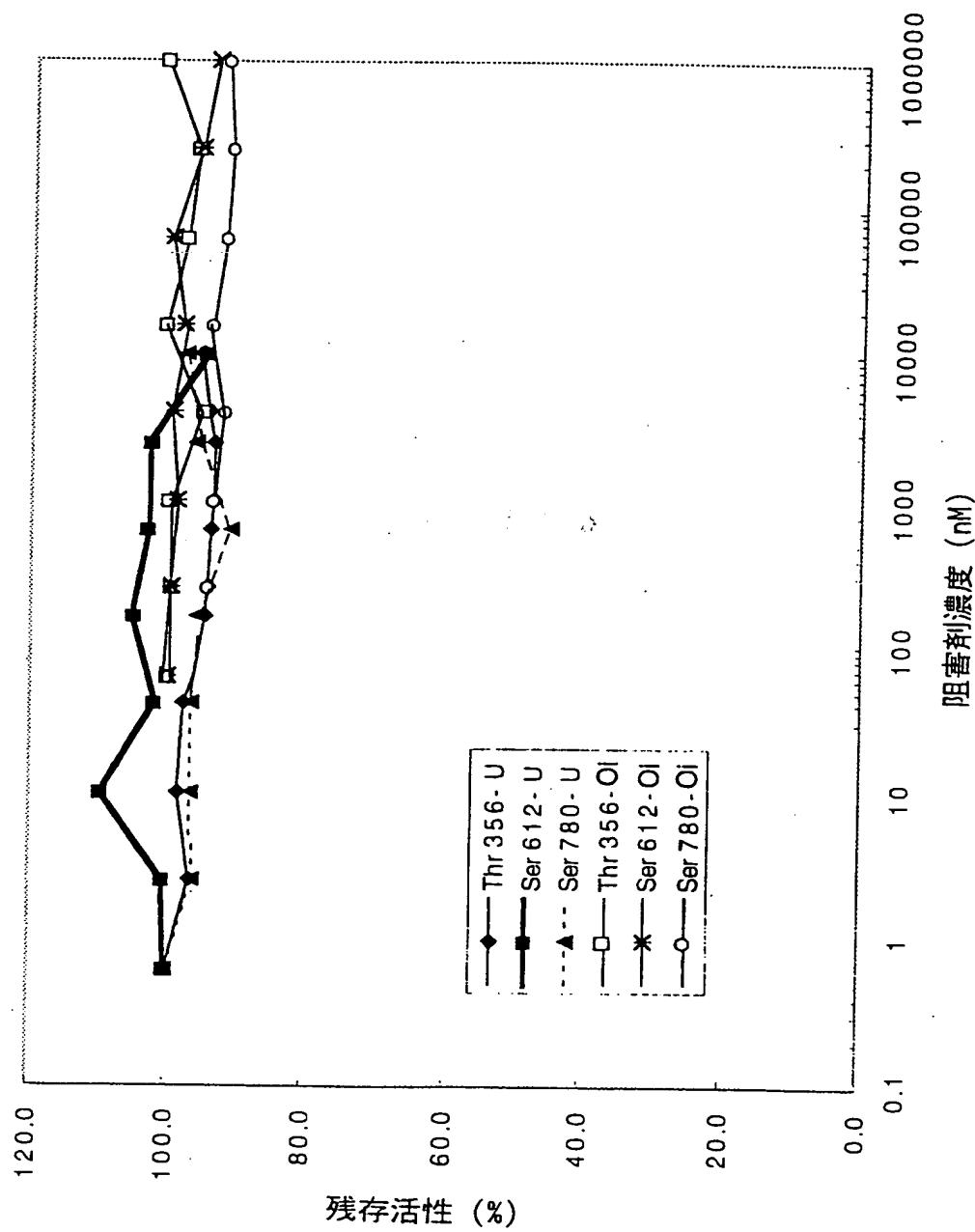
図 8



THIS PAGE BLANK (USPTO)

9 / 13

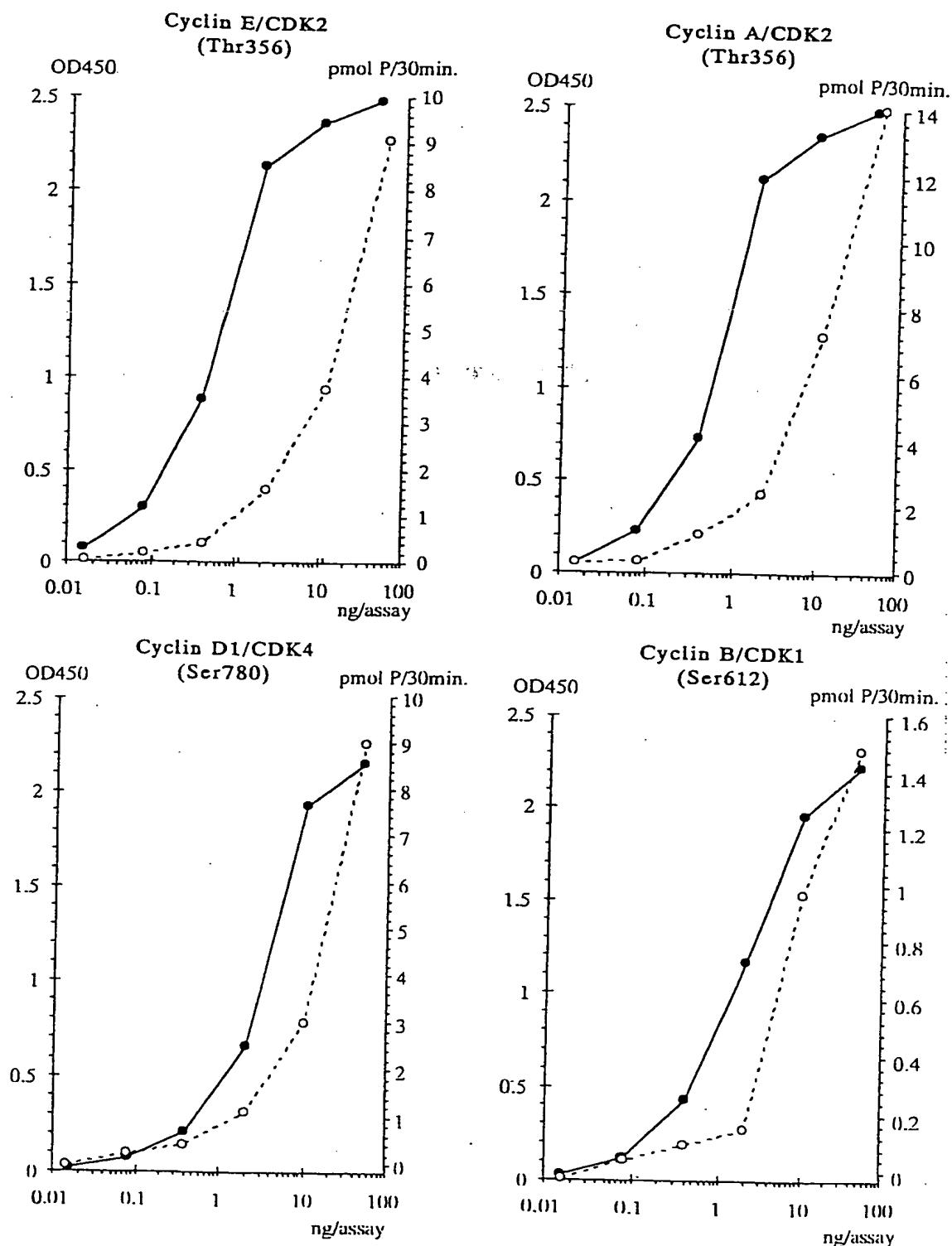
図 9



THIS PAGE BLANK (USPTO)

10 / 13

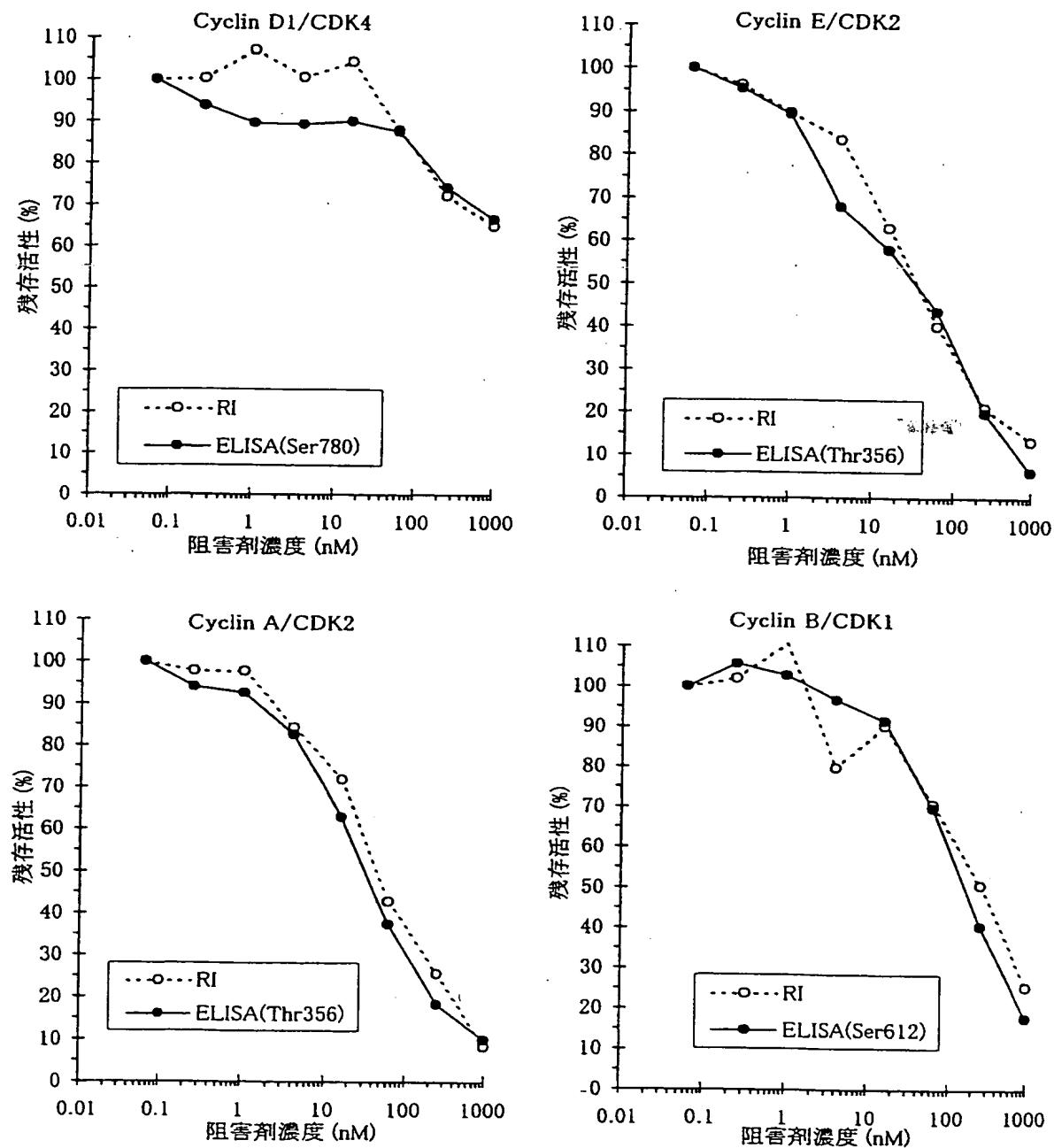
図 10



THIS PAGE BLANK (USPTO)

11 / 13

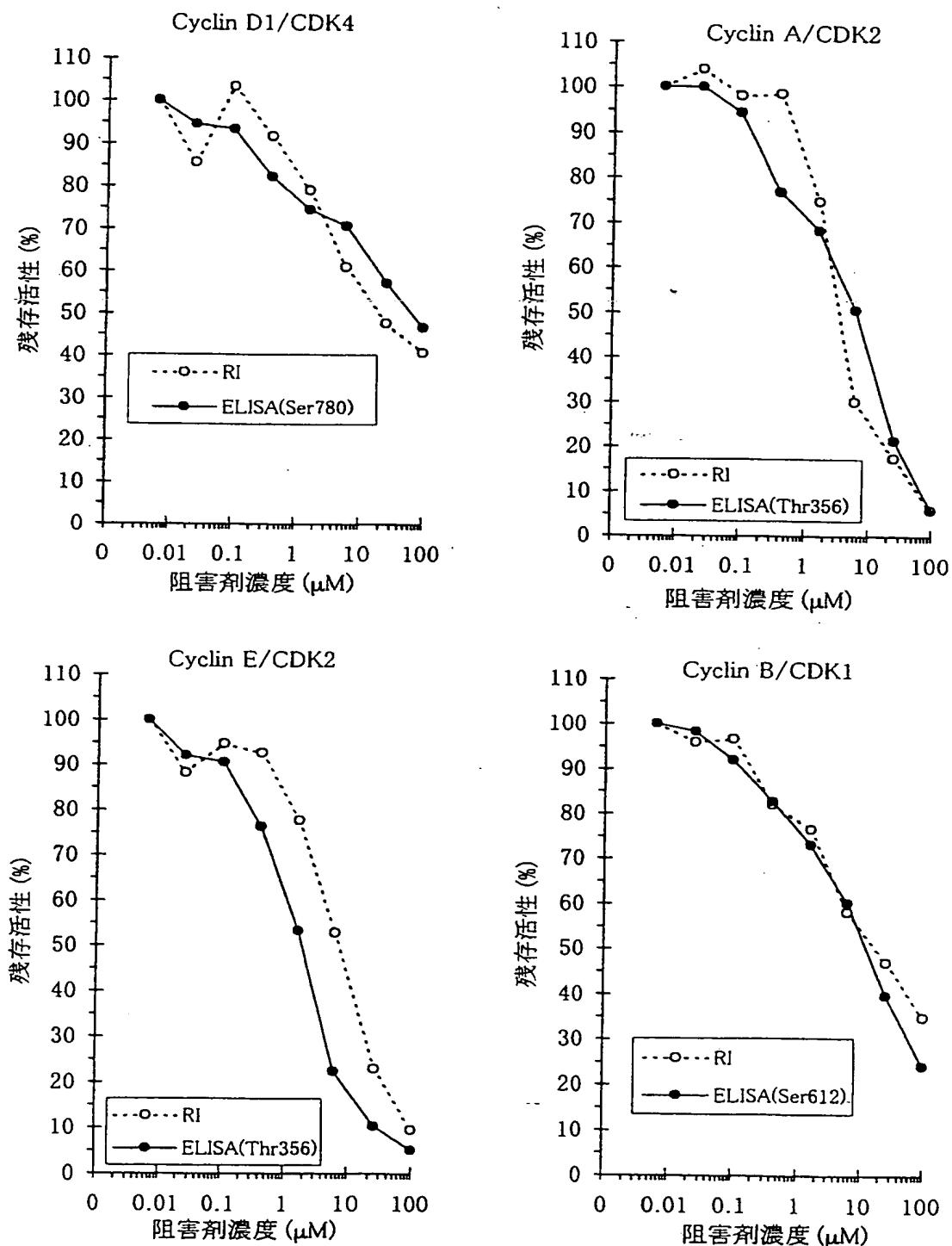
図 11



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

12 / 13

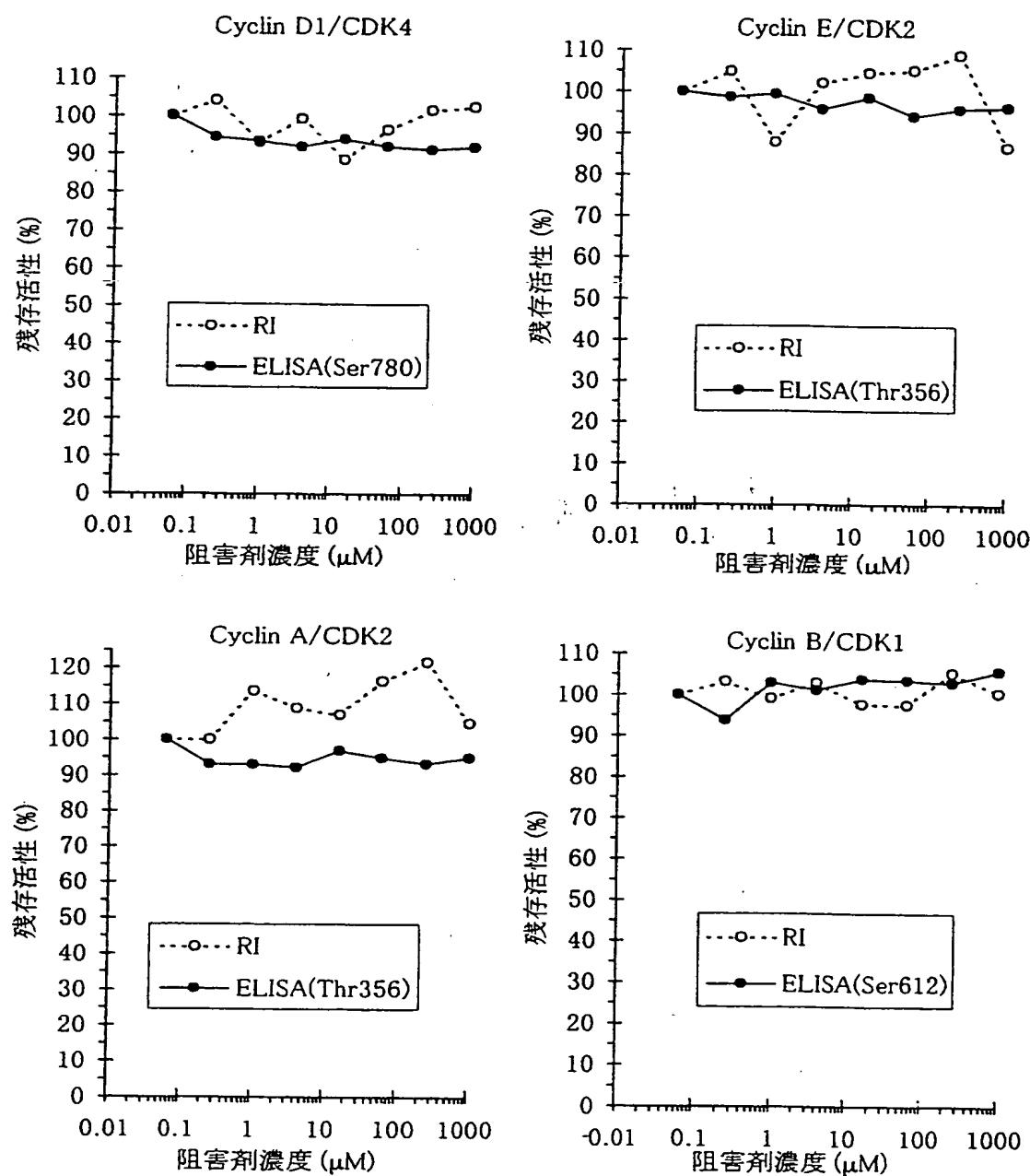
図 12



THIS PAGE BLANK (USPTO)

13/13

図13



THIS PAGE BLANK (USPTO)

## SEQUENCE LISTING

<110> Medical & Biological Laboratories CO., LTD

<120> Method for Determining of Protein Kinase Activity of Cyclin/CDK Complex.

<130> M3-104PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-221612

<151> 1999-08-04

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 1

Ser Phe Glu Thr Gln Arg Thr Pro Arg Lys Ser Asn Leu Cys

1

5

10

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Peptide

<400> 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ser Phe Glu Thr Gln Arg Thr Pro Arg Lys Ser Asn Leu Cys  
1 5 10

<210> 3  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7)  
<223> PHOSPHORYLATION

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Peptide

<400> 3  
Tyr Leu Ser Pro Val Arg Ser Pro Lys Lys Lys Gly Ser Cys  
1 5 10

<210> 4  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Peptide

<400> 4  
Tyr Leu Ser Pro Val Arg Ser Pro Lys Lys Lys Gly Ser Cys  
1 5 10

<210> 5  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Peptide

<220>  
<221> MOD\_RES

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<222> (7)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 5

Thr Arg Pro Pro Thr Leu Ser Pro Ile Pro His Ile Pro Cys  
1 5 10

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Peptide

<400> 6

Thr Arg Pro Pro Thr Leu Ser Pro Ile Pro His Ile Pro Cys  
1 5 10

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)

<223> PHOSPHORYLATION

<400> 7

Gly Gly Asn Ile Tyr Ile Ser Pro Leu Lys Ser Pro Tyr Lys Ile Cys  
1 5 10 15

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## Synthesized Peptide

<400> 8  
Gly Gly Asn Ile Tyr Ile Ser Pro Leu Lys Ser Pro Tyr Lys Ile Cys  
1 5 10 15

<210> 9  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 9  
ataggatcca tggaacacca gctcctgtgc 30

<210> 10  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 10  
ataactcgagg atgtccacgc tccgcacgta 30

<210> 11  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 11  
ataagatcta tgaaggagga cggcggcgcg 30

<210> 12  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

THIS PAGE BLANK (USPTO)

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 12

atactcgagc gccattccg gcccgtgct

30

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 13

ataggatcca tggcgctccg agtcaccagg

30

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 14

atactcgagc acctttgcca cagccttggc

30

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 15

ataggatcca tggaaagatta tacccaaata

30

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 16

atactcgaga ctcttcttaa tctgattgtc

30

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 17

ataggatcca tggagaactt caaaaagggtg

30

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 18

atactcgagt cagagtgcga gatggggtag

30

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 19

catggatcca tggctacctc tcgatatgag

30

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

7/7

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 20

catgtcgacc tccggattac cttcatcctt

30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05219

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.C1<sup>7</sup> G01N33/573, G01N33/50, G01N33/15, C12Q1/48, C07K7/08, C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1<sup>7</sup> G01N33/573, G01N33/50, G01N33/15, C12Q1/48, C07K7/08, C07K16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JICST, BIOSIS, WPIL

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A         | Shinichi INOMATA, et al., "Keratinocyte no Zoushoku, Ganka no Target; Cycline·cdk Fukugoutai", Nishinippon Hifuka, Vol.57, No.4, 1995, pp.687-695 | 1-23                  |
| A         | Seiji OGAWA, "Saibou Shuuki Yokusei Inshi", Ketsueki · Shuyouka, Vol.32, No.2, 1996, pp.123-128   | 1-23                  |

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
31 October, 2000 (31.10.00)Date of mailing of the international search report  
21 November, 2000 (21.11.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/05219

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' G01N33/573, G01N33/50, G01N33/15, C12Q1/48, C07K7/08, C07K16/18

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' G01N33/573, G01N33/50, G01N33/15, C12Q1/48, C07K7/08, C07K16/18

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |            |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報   | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2000年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2000年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2000年 |

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST, BIOSIS, WPIL

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A               | 猪俣慎一ほか「ケラチノサイトの増殖、癌化のターゲットーサイクリン・cdk複合体ー」, 西日本皮膚科, 第57巻, 第4号, 1995年, pp687-695 | 1-23             |
| A               | 小川誠司「細胞周期抑制因子」, 血液・腫瘍科, 第32巻, 第2号, 1996年, pp123-128                            | 1-23             |

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

31.10.00

## 国際調査報告の発送日

21.11.00

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官（権限のある職員）

竹中靖典

2 J 9507

(印)

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**